

Aus der Klinik und Poliklinik für
Frauenheilkunde und Geburtshilfe – Innenstadt
Klinikum der Ludwig-Maximilians-Universität München
Direktor: Prof. Dr. med. Klaus Frieze

Der Einfluss von Glykodelin O aus Ovarialkarzinomaszites auf dendritische Zellen

Dissertation

zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität München

vorgelegt von

Elisabeth Rampf aus Erding

2012

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter:

Prof. Dr. rer. nat. Udo Jeschke

Mitberichterstatter:

Prof. Dr. Thomas Knösel

Prof. Dr. Elfriede Nöbner

Mitbetreuung durch den promovierten Mitarbeiter:

PD Dr. med. Christoph Scholz

Dekan:

Prof. Dr. med. Dr. h.c. Maximilian Reiser, FACR, FRCR

Tag der mündlichen Prüfung:

11.10.2012

Inhalt

1	Einleitung	5
1.1	Das Ovarialkarzinom im Überblick	5
1.2	Glykodelin	6
1.2.1	Überblick und Einführung	6
1.2.2	Strukturanalyse	8
1.2.3	Biologische Funktion	10
1.3	Dendritische Zellen	12
1.3.1	Überblick Immunsystem und Rolle dendritischer Zellen	12
1.3.2	Historie, Vorkommen und Typen	12
1.3.3	Antigenaufnahme	13
1.2.4	Reifeinduktion, Reifung und Migration	14
1.3.5	Induktion einer Immunantwort	15
1.3.6	Steuerung der Immunantwort	16
1.3.7	Toleranz	17
1.4	Zusammenschau und Fragestellung	19
2	Material und Methoden	21
2.1	Geräte und Reagenzien	21
2.1.1	Laborgeräte	21
2.1.2	Chemikalien und sonstiges Verbrauchsmaterial	22
2.1.3	Puffer, Medien, Seren, Lösungen	23
2.1.4	Reagenziensets	23
2.1.5	Chemokine und Zytokine	23
2.1.6	Antikörper	24
2.2	Aufbereitung der Analysekomponenten	24
2.2.1	Aufreinigung von Glykodelin aus Ovarialkarzinomazites	24
2.2.2	Generierung dendritischer Zellen	30
2.3	Kultur monozytenabgeleiteter dendritischer Zellen mit Glykodelin und/oder Reifestimulatoren	31
2.4	Analyseverfahren	32
2.4.1	Phasenkontrastmikroskopie	32
2.4.2	Durchflusszytometrische Analyse von Oberflächenmarkern	33
2.4.3	Durchflusszytometrische Bestimmung der Endozytoseaktivität	36
2.4.4	Verifizierung der lymphoproliferativen Potenz von dendritischen Zellen mittels gemischter Lymphozytenkultur und Bromdesoxyuridin-Enzyme-Linked Immunosorbent Assay	36
2.4.5	Messung der Zytokinsekretion durch Enzyme-Linked Immunosorbent Assay	37
2.5	Statistik	38

3	Ergebnisse	39
3.1	<i>Glykodelinaufreinigung aus Aszites</i>	39
3.1.1	Dot blot-Analyse	39
3.1.2	Konzentrationsbestimmung durch Bradfordtest	40
3.1.3	Westernblotanalyse	41
3.1.4	Testung auf Probenverunreinigung	41
3.2	<i>Begutachtung von Monozyten/monozytenabgeleiteten dendritischen Zellen.</i>	42
3.2.1	Phasenkontrastmikroskopische Beurteilung	42
3.2.2	Durchflusszytometrische Oberflächenmarkeranalyse.	42
3.2.3	Endozytotische Aktivitätstestung im Dextran-Phagozytoseversuch	44
3.2.4	Lymphoproliferative Aktivität	46
3.2.5	Zytokinsekretionsprofil	46
4	Diskussion	49
4.1	<i>Zusammenfassung der Ergebnisse</i>	49
4.2	<i>Beurteilung der Analysekomponenten.</i>	50
4.2.1	Gewinnung von Aszitesglykodelin	50
4.2.2	Auswahl der Glykodelinkonzentrationen	52
4.2.3	Generierung von monozytenabgeleiteten dendritischen Zellen	52
4.2.4	Reifeinduktion monozytenabgeleiteter dendritischer Zellen	53
4.3	<i>Diskussion eigener Ergebnisse vor dem Hintergrund aktueller Literatur.</i>	54
4.3.1	Oberflächenmarkerexpression in der Fluorescence activated cell sorting-Analyse.	54
4.3.2	Endozytotische Aktivität	57
4.3.3	Lymphoproliferative Kapazität	57
4.3.4	Sezerniertes Zytokinmuster	58
4.3.5	Zusammenfassung	60
4.3.6	Perspektiven in Forschung und Klinik	60
5	Literaturverzeichnis	62
6	Abkürzungsverzeichnis	71
7	Abbildungsverzeichnis	74
8	Danksagung	75
9	Veröffentlichungen	76

1 Einleitung

1.1 Das Ovarialkarzinom im Überblick

Am Ovarialkarzinom erkranken weltweit nach Schätzungen der WHO etwa 200.000 Frauen jährlich. Das häufigste Auftreten beobachtet man in Westeuropa und Nordamerika, besonders selten dagegen erkranken Chinesinnen und Frauen aus Zentralafrika (Boyle, Levin 2008).

In der Inzidenzenfolge aller weiblichen bösartigen Tumore in Deutschland steht das Ovarialkarzinom mit 9.660 (4,7%) Neuerkrankungen jährlich mittlerweile an fünfter Stelle. Nach dem Gebärmutterhalskrebs nimmt es damit den zweiten Platz aller gynäkologischen Malignome ein (Robert-Koch-Institut (RKI), 2008).

Bezüglich der Mortalität belegen die malignen Ovarialtumore in der Bundesrepublik den fünften Platz nach Brustkrebs, Darmkrebs, Bronchial- und Pankreaskarzinom. Diese hohe Sterblichkeitsrate (5.479 Sterbefälle jährlich) ist vor allem auf den symptomarmen Verlauf der Erkrankung in der Frühphase zurückzuführen, wodurch die Diagnosestellung in etwa 70% der Fälle erst in fortgeschrittenen Stadien erfolgt. Darin liegt auch der wesentliche Grund für die niedrigen Gesamtüberlebensraten nach 5 Jahren, die mit etwa 47% beziffert sind (RKI, 2008).

Das Karzinom leitet sich vom ovariellen Oberflächenepithel, dem sogenannten Keimepithel ab und stellt die Mehrzahl (90%) aller bösartigen Eierstockstumore dar. Das Hauptmanifestationsalter für die Erkrankung liegt zwischen dem 60. und 70. Dezenium.

Gemäß der Theorie der ununterbrochenen Ovulation (Fathalla, 1971), dass jeder Eisprung mit konsekutiver Reparatur/Proliferation des Keimepithels das Ovarialkarzinomrisiko erhöht, stellen frühe Menarche/späte Menopause, Infertilität und Nulliparität bekannte Risikofaktoren dar, die diese Hypothese stützen. Im Gegensatz dazu scheinen sich viele Schwangerschaften sowie die Einnahme von Ovulationshemmern protektiv auszuwirken (Narod et al., 1998). Der stärkste Risikofaktor für das Auftreten eines Ovarialkarzinoms besteht bei positiver Familienanamnese. Etwa 1/10 aller Ovarialkarzinome sind hereditär bedingt, wobei in den meisten Fällen ursächlich eine Keimbahnmutation in den Genen BRCA-1 (*BR*east *C*Ancer) oder BRCA-2 zugrunde liegt (Risch et al. 2001).

Die Bedeutung einer verbesserten Tumorfrüherkennung macht die Diskrepanz der 5-Jahres-Überlebensraten im Vergleich von Frühstadium FIGO I (*Fédération Internationale de Gynécologie et d' Obstétrique*, 90%) zum Spätstadium FIGO IV (unter 20%) klar (Heintz et al. 2006). Derzeit kommt hier die bedeutenste Rolle der Transvaginalsonografie zu, allerdings liefern verschiedene Studien (van Nagell et al. 2007; Partridge et al. 2009; Fishman et al. 2005) teilweise unterschiedliche Ergebnisse und es existieren keine eindeutigen Daten, die beispielsweise eine jährliche Routinesonografie als Screeningmethode rechtfertigen (Burges, Schmalfeldt 2011).

Daneben steht die Rolle tumorassoziierter Antigene im Serum, sogenannter Tumormarker als Screeningparameter auch beim Ovarialkarzinom in der Diskussion. Der bekannteste ist CA-125 (*Cancer Antigen 125*), ein hochmolekulares Glykoprotein, welches bei über 80% der fortgeschrittenen Karzinompatientinnen erhöhte Werte im Serum aufweist (Bast et al. 1983) wohingegen in frühen Stadien lediglich in 67% der Fälle ein solcher Nachweis geführt werden konnte. Insgesamt weist CA-125 jedoch eine relativ geringe Spezifität auf und eignet sich daher nicht zum Einsatz für Früherkennung oder Differentialdiagnose, es lässt sich allerdings als Parameter zur Verlaufskontrolle nutzen (Bast et al. 2005).

An therapeutischen Optionen gilt die maximale operative Tumoresektion als Basis, stadienabhängig in Kombination mit einer postoperativen Polychemotherapie (Burges, Schmalfeldt 2011).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass trotz Ausschöpfung einer maximalen Therapie das schlechte Langzeitoutcome dieses malignen Genitaltumors weiterhin neue, innovative Ansätze erfordert. Studienschwerpunkte liegen in der Erforschung von alternativen/ adjuvanten Therapiemethoden und der Etablierung effektiver, systematischer Screeningverfahren, die unter Umständen bereits präinvasive Tumorstadien erkennen lassen. Die biologische Vielfalt des Ovarialkarzinoms und das Verständnis komplexer Immunregulationsmechanismen in der Tumorgenese stellen hierbei die Herausforderung aber zugleich eine Vielfalt an neuen Angriffspunkten dar.

1.2 Glykodelin

1.2.1 Überblick und Einführung

Glykodelin (Gd) ist ein Glykoprotein des menschlichen Reproduktionstraktes. Seine bekannten physiologischen Funktionen liegen in der Fertilisationshemmung und lokaler Immunsuppression während der frühen Schwangerschaft (Seppälä et al. 2002). Vorwiegend findet die Gd-Produktion im sekretorischen und dezidualisierten Endometrium statt (Julkunen et al. 1986). Darüber hinaus konnte die Expression von Glykodelinisoformen

auch in verschiedenen gynäkologischen Tumorgeweben nachgewiesen werden, darunter im Ovar (Kamarainen et al. 1996; Horowitz et al. 2001) und in tumorassoziierten Flüssigkeiten wie Aszites, malignen Ovarialzysten und Patientenseren (Bischof et al. 2005; Jeschke et al. 2009).

Glykodelin gehört zur Superfamilie der Lipocaline – dabei handelt es sich um Proteine, die vor allem eine Rolle im Transport von hydrophoben Molekülen spielen (Flower et al, 1996). In den 70er- und 80er-Jahren konnten mehrere Forscher unabhängig voneinander ein Glykoprotein in der menschlichen Plazenta, der Amnionflüssigkeit, der Dezidua und im Seminalplasma nachweisen. Aufgrund dieser unterschiedlichen Beobachtungen entstanden verschiedene Namen wie PAEP (*progesterone-associated endometrial protein*) oder PP14 (*placental protein 14*) (Joshi et al. 1980; Bohn et al. 1982). Den heute allgemein gebräuchlichen Namen »Glykodelin« verdankt das Protein vor allem der Entdeckung von bemerkenswerten Unterschieden in seinen Glykosilierungsmustern, welchen eine Schlüsselfunktion für die unterschiedlichen biologischen Verhaltensweisen zukommt. Einen Überblick über nachweisbare Glykodelinisoformen in verschiedenen Geweben und Zelltypen gibt nachfolgende Auflistung (Lapid, Sharon 2006):

Glykodelin	Lokalisation	Referenz
GdA (amniotic)	Amnionflüssigkeit	Riittinen et al. 1989
	sekretorisches Endometrium	Julkunen et al. 1986
	Dezidua	Julkunen et al. 1986
GdS (seminal plasma)	Seminalplasma, Seminalvesikel	Julkunen et al. 1984
GdF (follicular fluid)	Ovar	Kamarainen et al. 1996
	Follikelflüssigkeit	Tse et al. 2002
GdC (cumulus matrix)	Kumuluszellen	Chiu et al. 2006
unbenannte Glykodeline	Eileiter	Julkunen et al. 1986
	Serum	Julkunen et al. 1985
	Brust, Brustkrebs	Kamarainen et al. 1999
	ovarielle Tumore	Kamarainen et al. 1996
	andere gynäkologische Tumore	Horowitz et al. 2001
	synoviale Sarkome	Kamarainen et al. 1998
	glanduläres Gewebe	Kamarainen et al. 1997
	Knochenmark	Kamarainen et al. 1994, Morrow et al. 1994

Tab. 1: Glykodelinisoformen und Vorkommen

1.2.2 Strukturanalyse

Die Gencodierung von Glykodelin liegt auf dem langen Arm des Chromosom 9 im Abschnitt 34 (Van Cong et al. 1991). Für die mRNA (*messenger RNA*) existieren mehrere Splice-Varianten (Kamarainen et al. 1999; Koistinen et al. 1997). Das Molekulargewicht von aus Amnionflüssigkeit gewonnenem Glykodelin beträgt 28 kDA (Identifikation mittels SDS-PAGE, *sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*) wohingegen es sich unter Gelfiltrationsbedingungen als homodimeres Protein mit ca. 60 kDA darstellt (Westwood et al. 1988).

Die Primärstruktur besteht aus 180 Aminosäuren, hiervon entsprechen 18 Aminosäuren einer Signalsequenz, und zeigt eine starke Ähnlichkeit zu β -Lactoglobulin, einem Milchprotein, dass sich hauptsächlich bei Kühen, aber auch vielen anderen Säugern findet, beim Menschen jedoch nicht vorkommt (Julkunen et al. 1988). Die beiden identischen Untereinheiten werden durch nichtkovalente Bindungen zusammengehalten; das Aminosäurerückgrat enthält außerdem vier Cysteinreste, welche intermolekular Disulfidbrücken bilden (Julkunen et al. 1988) und somit eine wichtige Aufgabe für die tertiäre Erscheinungsform des Proteins wahrnehmen. An Sekundärstrukturen finden sich vor allem β -Faltblätter. Außerdem besitzt Glykodelin A zwei unpolare Bereiche an seiner Oberfläche.

Der Kohlehydratanteil beträgt 17,5% des Gesamtproteins (Bohn et al. 1982). Glykodelin besitzt potentielle Glykosilierungsstellen an speziellen Asparagin (Asn)-Resten (sogenannte N-Glykosilierung). Diese finden sich bei Asn28, Asn63 und Asn85, wobei jedoch nur die ersten beiden tatsächlich eine Glykosilierung aufweisen (Julkunen et al. 1988), wie unten stehende Abbildung zeigt:

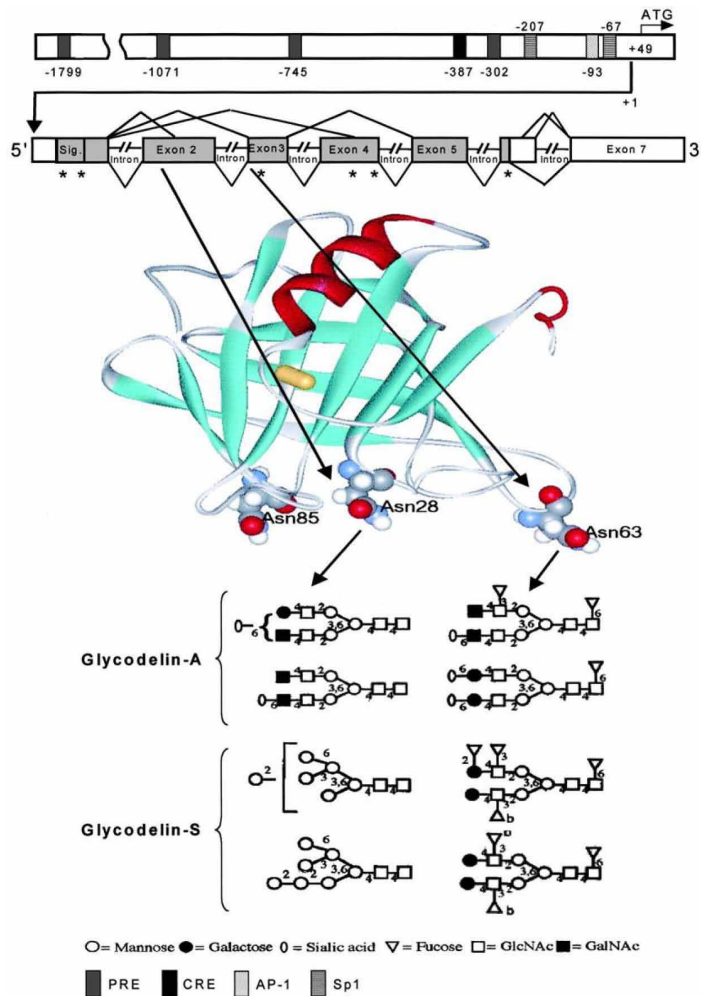


Abb. 1: Molekularstruktur Glykodelin

(Dell et al. 1995; Morris et al. 1996; Seppala et al. 2002)

Der obere Bildteil zeigt die Promoterregion des codierenden Gens PAEP, direkt darunter ist das Splicingmuster des Glykodelin-Gens abgebildet. Grau hinterlegte Bereiche repräsentieren codierende Exons. Die molekulare Tertiärstruktur des Glykoproteinmonomers ist mittig dargestellt. Die drei potentiellen Asn-Glykosylierungsstellen (kugelförmige Kennzeichnung) und mögliche Beispiele für komplexe Zuckerstrukturen sind in Pfeilfolge des basalen Bildausschnitts aufgeschlüsselt.

Trotz identischer Primärsequenz wiesen GdA und GdS heterogene physikalische Verhaltensmuster auf (Koistinen et al. 1996), welche auf Unterschiede im Glykosylierungsmuster deuteten. Genauere Untersuchungen diesbezüglich erbrachten eine differenziertere Strukturanalyse dieser beiden Moleküle (Dell et al. 1995; Morris et al. 1996):

An der Bindungsstelle Asn28 finden sich bei GdA Oligomannose, komplexe sowie hybridartige Strukturen, während Asn63 lediglich komplexe Glykanstrukturen aufweist. Hauptsächlich handelt es sich bei beiden hierbei um sialylierte und fucosylierte N-Acetyl-lactosamin (lacNAc) und di-N-Acetyl-lactosamin (lacdiNAc)-Sequenzen. Lektinbindungsstudien mit *Wisteria floribunda* (japanischer Blauregen) und *Sambus nigra* (schwarzer Holunder) – welche speziell N-Acetylgalactosamin (GalNAc) und N-Acetylneuramin (NeuAc)-GalNAc binden – zeigten Reaktionsfähigkeit mit GdA, nicht jedoch mit GdS.

Dieser Glykodelinsubtyp weist vielmehr keine sialylierte Glykane auf und ist besonders fruktosereich. Die Asn28-Bindungsstelle enthält nur Oligomannose während sich am Asparaginrest 63 vor allem komplexe Oligosaccharide vom Typ Lewis^x und Lewis^y befinden. GdF besitzt einige ähnliche Eigenschaften wie GdA, verschiedene vergleichende Tests konnten jedoch auch Unterschiede aufzeigen, wie etwa unterschiedliches Lektinbindungsverhalten. (Chiu et al. 2003).

Bindungsstelle	GdA	GdS
Asn28	Oligomannose, hybride und komplexe Strukturen mit sialylierten lacdiNAc-Sequenzen	Oligomannosestrukturen
Asn63	komplexe Strukturen mit sialylierten/fucosylierten lacdiNAc-Sequenzen	komplexe Strukturen mit fucosereichen Lewis ^x und Lewis ^y -Sequenzen

Tab. 2: Übersicht Glykosilierungsmuster von GdA und GdS im Vergleich

Diese Beobachtungen weisen auf ein geschlechts- und gewebsspezifisches Glykosilierungsmuster und bieten damit den idealen Ausgangspunkt für Untersuchungen, um die signifikante Rolle der Glykosilierung für die biologische Funktionalität von Proteinen zu illustrieren. In dem Zusammenhang am besten beschrieben sind bisher Aufgaben der Glykodeline A und S.

1.2.3 Biologische Funktion

Beiden kommt eine wichtige Rolle im Fertilisationsgeschehen zu. Die Glykodelinsynthese scheint zeit- und ortsabhängig reguliert zu sein. Während GdA im proliferativen Endometrium kaum nachweisbar ist, kommt es im sekretorischen Stadium und in der Frühschwangerschaft zu starken Konzentrationsanstiegen (Julkunen et al. 1986), womöglich um überzählige Befruchtungen zu verhindern. Dies geschieht durch die effektive Hemmung der Bindung des Spermiums an die Zona pellucida der Eizelle (Oehninger et al. 1995), wahrscheinlich durch direkte Interaktion zwischen dem Spermium und Glykodelin. Dieselbe Beobachtung gilt für Glykodelin F (Chiu et al. 2003). Im Gegensatz dazu inhibiert GdS nicht die Spermium-Oozytenbindung (Morris et al. 1996). Es scheint vielmehr dafür zu sorgen, dass die Kapazitationsphase der Spermien nicht bereits im Seminalplasma einsetzt (Chiu et al. 2005).

Neben diesen kontrazeptiven Aufgaben scheint Glykodelin A immunsuppressive Eigenschaften zu besitzen, die vor allem eine wichtige Rolle für die Toleranz des Fetus im Mutterleib spielen. Obwohl der kindliche Embryo genetisch gesehen ein Semiallograft darstellt, kommt es in der normalen Schwangerschaft zu keiner Abstoßungsreaktion. Dafür verantwortlich scheint ein einzigartiges immunologisches Milieu an der feto-maternalen Schnittstelle (Dezidua-Trophoblast). Man nimmt an, dass Glykodelin A hierbei wichtige immunsuppressive Aktivität übernimmt. Dafür sprechen hohe Proteinkonzentrationen

um den Zeitpunkt der Implantation und früher Schwangerschaft (Julkunen et al. 1985) sowie bereits beschriebene, direkt-immunmodulatorische Funktionen: GdA hemmt *in vitro* direkt die Proliferation und Aktivität von phytohämagglutinin (PHA)-stimulierten T-Lymphozyten (Pockley et al. 1988; Pockley, Bolton 1989; Rachmilewitz et al. 1999). Die Unterdrückung geschieht vermittelt Apoptoseinduktion in den betreffenden T-Zellen (Mukhopadhyay et al. 2001). Die Bindung an die T-Zelle erfolgt dabei unter anderem über CD45 (*cluster of differentiation*), einem Oberflächenrezeptor mit Tyrosin-Kinase-Eigenschaften (Rachmilewitz et al. 2003). Jüngere wissenschaftliche Untersuchungen lenken das Augenmerk auf einen alternativen Mechanismus der Immunmodulation. Das T-Zell-Grenzwertmodell beschreibt deren Aktivierung durch Triggerung einer bestimmten Anzahl von T-Zell-Rezeptoren (TCR). Rachmilewitz et al. konnten zeigen, dass GdA seine inhibitorische Wirkung auch vermittelt, indem es diese Aktivierungsschwelle anhebt und damit dafür sorgt, dass die T-Lymphozyten weniger empfindlich für inflammatorische Signale werden (Rachmilewitz et al. 2001).

Weitere immunsuppressive Effekte sind beschrieben für natürliche Killerzellen und B-Lymphozyten. Glykodelin hemmt direkt *in vitro* die zellvermittelte Lyse durch natürliche Killerzellen (Okamoto et al. 1991). Untersuchungen zur Wirkung auf die B-Zell-Regulation dokumentieren eine Unterdrückung der Zellproliferation und -aktivierung durch verminderte Immunglobulin(Ig)-M-Sekretion und MHC (Major Histocompatibility Complex)-II-Expression (Yaniv et al. 2003). CD14⁺Monozyten/Makrophagen besitzen zwar spezifische Rezeptoren für Glykodelin (Miller et al. 1998), eine Apoptoseinduktion, vergleichbar wie bei T-Lymphozyten, wird dadurch jedoch nicht ausgelöst (Mucopadhyay et al. 2001).

Glykoform	Funktion
GdA	Bindungshemmung Spermium-Eizelle Immunsuppression
GdS	Aufrechthaltung Nicht-Kapazitation unreifer Samen
GdF	Bindungshemmung Spermium-Eizelle

Tab. 3: Überblick bekannte Funktionen der unterschiedlichen Glykodelinformen

Tumore bedienen sich verschiedener Überlebensstrategien; unter anderem umgehen sie durch lokal immunsuppressive Mechanismen die körpereigene Abwehr und schaffen sich so ein tolerantes Umgebungsmilieu, welches ihnen ungehemmtes Wachstum und Ausbreitung ermöglicht (Rabinovich et al. 2007).

Dendritische Zellen (DC) nehmen eine Schlüsselposition in der Erzeugung und Aufrechterhaltung von Immunantworten auch gegen Tumorzellen ein (Guermontprez et al. 2002). In weltweiten Vakzinierungsstudien macht man sich diese Antitumor-Eigenschaften der DC zunutze. Andererseits tragen Fehler im DC-System dazu bei, dass Krebszellen der Immunabwehr entgehen und sind mit einer der Hauptursachen für das Scheitern von Immuntherapien. Diese Hauptrolle rechtfertigt einen genaueren Blick auf die Arbeitsweise der DC im Netzwerk der Immunabwehr.

1.3 Dendritische Zellen

1.3.1 Überblick Immunsystem und Rolle dendritischer Zellen

Immunität resultiert aus dem Zusammenspiel zweier funktioneller Hauptsysteme:

Die entwicklungsgeschichtlich ältere, angeborene Immunabwehr zeichnet sich durch sofortige, relativ unspezifische Abwehrmaßnahmen aus. Zu ihren Einheiten gehören als physischer Schutzmantel zum Beispiel eine intakte Epidermis, antimikrobielle Substanzen, die Proteine des Komplementsystems im Blut und auf zellulärer Ebene phagozytierende Zellen wie Makrophagen, die Granulozyten und natürliche Killerzellen (NK-Zellen).

Die erworbene oder adaptive Immunabwehr und ihre Hauptakteure, die Lymphozyten, stellen demgegenüber ein hochspezifisches System dar, welches zum einen in der Lage ist, auf bestimmte Antigene selektiv zu reagieren, zum anderen ein immunologisches Gedächtnis zu erschaffen, um damit beim erneuten Aufeinandertreffen mit dem Pathogen schneller und effizienter zu reagieren.

Dendritische Zellen, als potenteste Vertreter der Gruppe sogenannter professioneller antigenpräsentierender Zellen (APC), sind hochspezialisierte Immunzellen, die als Bindeglied am Scheideweg dieser beiden Systeme agieren: Sie sind Schlüsselfiguren in Initiationsprozessen des adaptiven Immunsystems; so besitzen sie die einmalige Fähigkeit, naive T-Lymphozyten durch Antigenpräsentation so zu stimulieren, dass diese antigenspezifische, zytotoxische Eigenschaften ausbilden (Banchereau et al. 2000). Eine entscheidende Funktion kommt ihnen jedoch auch in der Entwicklung und Aufrechterhaltung von Toleranz gegenüber körpereigenen Selbstantigenen zu (Matzinger, 1994). Verschiedene wissenschaftliche Experimente belegen ihre Funktion in unspezifischen Abwehrprozessen, unter anderem als Aktivatoren von NK-Zellen (Fernandez et al. 1999; Ferlazzo et al. 2002).

1.3.2 Historie, Vorkommen und Typen

DC wurden erstmals 1868 von Paul Langerhans in der Epidermis identifiziert und nach ihrem Entdecker als »Langerhans Zellen« benannt (Langerhans, 1868). 1973 beschrieben Steinman und Cohn (Steinman, 1973) die von ihnen in der Milz von Mäusen entdeckten Zellen aufgrund ihrer charakteristischen mikroskopischen Morphe mit zahlreichen astförmig-verzweigten zytoplasmatischen Ausläufern als dendritische Zellen (gr. *dendros* = Baum). Erst Jahre später erkannte man, dass es sich bei beiden Entdeckungen um Zellen eines gemeinsamen Systems handelt (Schuler, Steinman 1985). 2011 erhielt R. Steinman für die Entdeckung und seine Forschungsarbeit zur Rolle dendritischer Zellen im Immunsystem den Medizinnobelpreis.

DC finden sich in nahezu allen Geweben des Körpers und repräsentieren dort ca. 1 – 2% aller Zellen. Ihren Ursprung nehmen sie in CD34⁺ Stammzellen des Knochenmarks, von welchen aus sie sich zu Vorläuferzellen des peripheren Blutes entwickeln können (Banchereau, Steinmann 1998).

Abhängig vom sie umgebenden Zytokinmilieu lassen sich vier DC-Subtypen mit unterschiedlichen Funktionen und Merkmalen unterscheiden: Zu den sogenannten konventionellen oder myeloiden DC zählen moDC (da von Blut-Monozyten abgeleitet), dermale oder interstitielle DC (DDC-IDC) und Langerhanszellen (LC). Daneben existieren plasmazytoide DC, deren Name aus der äußerlichen Ähnlichkeit zu Plasmazellen resultiert (Rossi, Young 2005).

Die Gewinnung dendritischer Zellen zu Forschungszwecken ist auf verschiedene Weise möglich, etwa durch direkte Isolation aus Blut und Gewebe oder über die Entwicklung aus verschiedenen Vorläuferzellen. Am besten zugänglich und aufgrund ihrer guten Antigenprozessionsfähigkeit besonders attraktiv sind myeloide DC, die sich *in vitro* aus peripheren CD14⁺ Blutmonozyten unter Einfluss der Zytokine IL-4 (*Interleukin*) und GM-CSF (*granulocyte monocyte colony-stimulating factor*) gewinnen lassen. Es handelt sich bei diesem Verfahren um ein etabliertes und vielfach beschriebenes Generierungsmodell (Romani et al. 1994; Bender et al. 1996; Thurner et al. 1999), welches in der Forschung am häufigsten verwandt wird. Vor diesem Hintergrund lassen sich DC reproduzierbar herstellen und eigene Ergebnisse interpretieren. Alternativ können DC aus CD34⁺ peripheren Stammzellen gewonnen werden, dies ist jedoch westlich kostspieliger und aufwendiger. IL-4 unterdrückt die Entwicklung von Monozyten zu Makrophagen (Jansen et al. 1989), GM-CSF fungiert als allgemeiner Wachstumsfaktor für die DC (Reid et al. 1992).

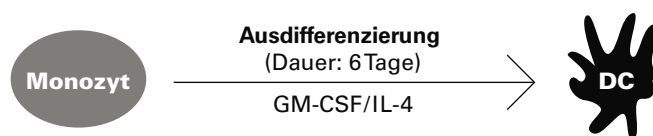


Abb. 2: Differenzierung eines Monozyten zur dendritischen Zelle (im *in vitro* Modell)

Entwicklung myeloider DC aus peripheren CD 14⁺ Blutmonozyten unter definiertem Zytokineinfluss

1.3.3 Antigenaufnahme

Im unreifen, unaktivierten Zustand besitzen DC eine hohe Phagozytosefähigkeit und patrouillieren als Wächter des Immunsystems auf der Suche nach Antigenen durch das Blut oder lassen sich im Gewebe nieder. Antigene nehmen sie dabei auf verschiedenste Art auf: Sie nutzen Mechanismen wie Phagozytose, Pinozytose oder rezeptorvermittelte Endozytose (Sallusto et al. 1995), um diese zu internalisieren.

So befinden sich auf der DC-Oberfläche eine Vielzahl von Rezeptoren, die pathogen-spezifische Muster binden. Dazu zählen beispielsweise die Toll-like Rezeptoren (TLRs), eine Gruppe von sogenannten PRRs (*Pattern Recognition Receptors*). Sie dienen der

Erkennung von PAMPs (*Pathogen Associated Molecular Patterns*), Strukturen, welche ausschließlich auf oder in Krankheitserregern vorkommen und entsprechende Genaktivierungen steuern.

Eine wichtige Gruppe der PRRs sind Rezeptoren aus der Familie der C-Typ Lektine. Sie binden kalziumabhängig Kohlehydratstrukturen aus Glykoproteinen körpereigener- oder fremder Strukturen. Zu ihnen zählen unter anderem DC-SIGN (*DC-specific intercellular adhesion molecule grabbing non-integrin*) der Makrophagen-Mannose-Rezeptor (MMR = CD 206), CD 205 (ein DC-spezifischer Multilektinrezeptor) oder CD 207 (Langerin) (Figdor et al. 2002).

Weitere Beispiele für TLR-Ligandenbindungen sind Peptidoglykane, virale doppelsträngige Ribonukleinsäure (dsRNA), LPS (Lipopolysaccharid) oder unmethylierte bakterielle Cytidin-Guanosin-Dinukleotid (CpG)-reiche DNA (Desoxyribonukleinsäure) (Jarrossay et al. 2001).

1.2.4 Reifeinduktion, Reifung und Migration

Alle DC bedürfen zum Erwerb ihrer vollen immunstimulatorischen Potenz einer Art abschließender Reifeinduktion. Dies ist möglich durch diverse physiologische Umgebungsstimuli, wie etwa oben angeführte Rezeptorinteraktionen mit mikrobiellen Produkten. Auch endogene Mediatoren wie Zytokine, Prostaglandine und Adenosinnukleotide aktivieren DC (Jonuleit 1997; Schnurr 2000). Zudem können aktivierte T-Zellen durch ihren membranintegrierten CD40-Liganden DC stimulieren (Caux et al. 1994). Zu Studienzwecken nutzt man für die Reifeinduktion häufig eine Mischung aus verschiedenen inflammatorischen Zytokinen wie Tumornekrosefaktor- α (TNF- α) oder IL-1 β .

Diese »Reifung« der immaturen DC führt zu einigen fundamentalen zellbiologischen Zustandsänderungen:

Ihre Phagozytosefähigkeit verringert sich, die Präsentation internalisierter und fragmentierter Peptide auf MHC-I und MHC-II findet hingegen verstärkt statt (Sallusto et al. 1996). Gleichzeitig erhöht sich ihre Mobilität, indem sie einerseits ihre zytoskelettale Struktur neu ausrichten und andererseits weniger Chemokinrezeptoren (CCRs) für inflammatorische Signale exprimieren (beispielsweise CCR1 oder CCR5), welche sie bisher im gefährdeten Gewebsareal gehalten hatten. Bestimmte Adhäsionsmoleküle wie CCR7 hingegen erleichtern nun den Wanderungsprozess und somit gelangen die aktivierten DC umgehend in die sekundär lymphatischen Organe (Sanchez et al. 2006). Nahezu zeitgleich können sie membrangebundene kostimulatorische Moleküle wie CD80 oder CD86 exprimieren (Banchereau et al. 2000) und eine Reihe löslicher Zytokine sezernieren, wie zum Beispiel IL-12, -6 oder -1 (Stephens et al. 2003; Hochrein et al. 2001).

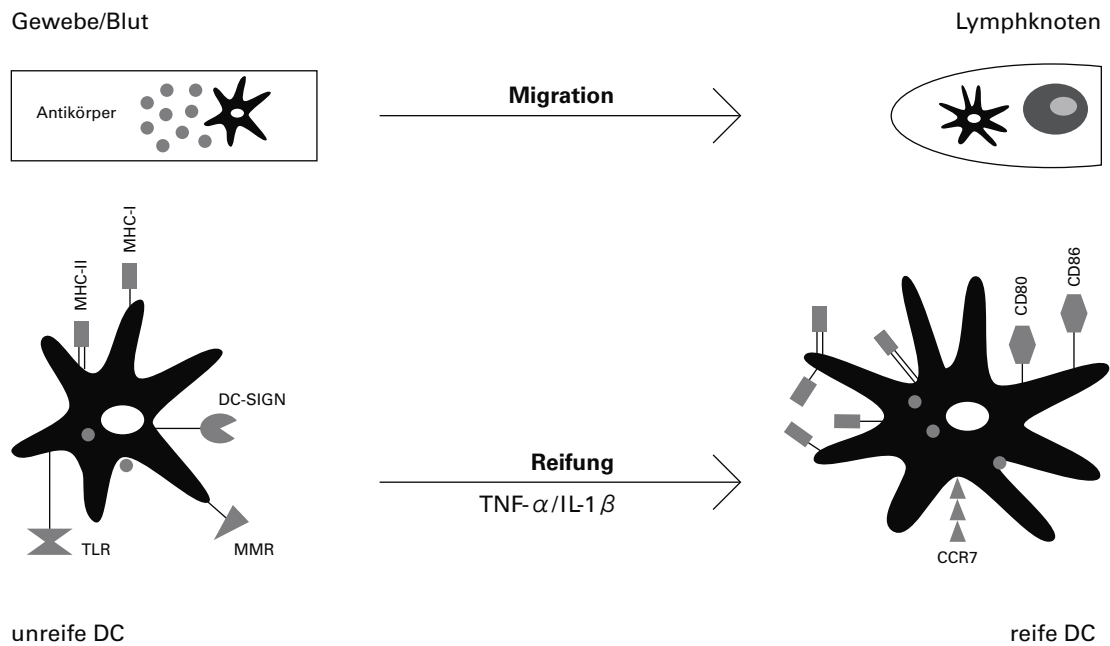


Abb. 3: Der Werdegang einer dendritischen Zelle

Im linken Bildabschnitt dargestellt eine unreife DC, welche im peripheren Gewebe / Blut über Phagozytose / Pinozytose und rezeptorvermittelte Endozytose (beispielsweise via Rezeptoren TLR / MMR / MHC / DC-SIGN) antigene Strukturen aufnimmt. Verschiedene Stimuli (hier TNF - α /IL-1 β ; inflammatorische Zytokine) induzieren die sogenannte Ausreifung der DC, welche mit zellbiologischen Zustandsveränderungen wie vermehrter / veränderter Rezeptorexpression sowie gesteigerter Migration einhergeht. Zielort der reifen DC sind sekundär lymphatische Organe (s. rechter Bildteil).

1.3.5 Induktion einer Immunantwort

T-Lymphozyten

Im Lymphknoten interagieren die DC mit den verschiedenen Lymphozytenpopulationen. Wie auch bei anderen APC erfolgt nach intrazellulärer Prozessierung die Präsentation von Peptidfragmenten auf der Zelloberfläche durch MHC-Moleküle. Diese MHC-Moleküle sind Proteinkomplexe auf Körperzellen und funktionieren als molekularer Zellausweis für die Immunerkennung durch Lymphozyten. MHC-I-Moleküle (Vorkommen auf allen kernhaltigen Zellen) präsentieren endogen im Zytosol aufgetretene antigene Strukturen den zytotoxischen CD8-T-Zellen. MHC-II (nur auf APC) hingegen machen exogen aufgenommene Partikel für CD4-Helferzellen "immunologisch sichtbar". Naive T-Zellen, die bisher noch keinen Antigenkontakt hatten, treffen in den peripheren lymphatischen Organen auf DC und werden aktiviert (sog. priming), falls es zur Antigenerkennung durch ihren TZ-Rezeptor (TCR) kommt (Mempel et al. 2004; Steinman et al. 1999).

DC sind darüber hinaus zur Kreuzpräsentation fähig (Heath et al. 2004), was einer Kombination aus oben genannten Präsentationswegen entspricht: MHC-I-Komplexe werden mit Antigenen extrazellulärer Herkunft beladen, wie etwa Virusanteile oder tumorassoziierte Proteine; diese werden somit direkt zugänglich für eine spezifische Elimination durch zytotoxische T-Lymphozyten (CTL).

Natürliche Killerzellen

NK-Zellen können andere Zellen ebenfalls direkt zerstören, durch Freisetzung zytotoxischer Granula: Perforine durchlöchern die feindliche Zellwand, Granzyme leiten dann die Apoptose ein. Im Gegensatz zur MHC-TCR-restringierten Aktivierung bei den CTL werden NK-Zellen ganz im Sinne der angeborenen Immunabwehr durch antigenunspezifische Signale angeregt. Hierbei spielen Zytokine eine bedeutende Rolle.

Über diese Zytokinsekretion üben aktivierte DC ihren Einfluss auf NK-Zellen aus (Walzer 2005). IL-2 ist bedeutsam für die effektive Interferonproduktion (IFN) der NK-Zellen (Granucci et al. 2004). Auch IL-12 und -18 induzieren die Herstellung von Interferon und verstärken die Zytotoxizität der NK-Zellen (Yu et al. 2001). IL-15 scheint die Proliferation der NK-Zellen anzuregen (Ferlazzo et al. 2004). Von reifen DC selbst sezernierte Typ I-Interferone können ebenso wie Interleukine NK-Zellzytotoxizität veranlassen (Granucci et al. 2004).

Neben diesen löslichen Signalgebern bedürfen NK-Zellen wahrscheinlich auch des direkten Zellkontakts zu den DC für ihre optimale Aktivierung (Fernandez, 1999).

1.3.6 Steuerung der Immunantwort

Die T-Helfer-Zellen (Th-Zellen) besitzen keinerlei zytotoxische Aktivität, sondern fungieren als Koordinator zwischen zellulärer Abwehr auf der einen (Th1-Zellen) und effektiver Stimulation der humoralen Antwort durch B-Lymphozyten (Th2-Zellen) auf der anderen Seite. Dieser Schritt ist somit bedeutend für die passende Auswahl der Immunreaktion des Körpers auf ein Pathogen. Th1-Helferzellen sezernieren vor allem IFN- γ und TNF- α . Diese tragen durch die Aktivierung von Makrophagen und CTL sowie die Produktion opsonierender Antikörper zur Bekämpfung von intrazellulären Erregern bei. Für Th2-Zellen charakteristisch ist die Ausschüttung von IL-10, -5, -4 oder -13, welche die neutralisierende Antikörperproduktion der B-Zellen fördern. Zusätzlich werden Mastzellen und eosinophile Granulozyten stimuliert. Th1- und Th2-Zellen inhibieren sich über definierte Zytokine gegenseitig. Durch diese Kreuzhemmung wird die einmal eingeschlagene Richtung der Immunantwort gesichert (Janeway et al. 2005).

Verschiedene Faktoren tragen dazu bei, dass aus einer ursprünglich nicht determinierten T-Helfer-0-Zelle (Th0) die Polarisation des Immunsystems in eine dieser beiden Richtungen erfolgt; unter anderem ausschlaggebend dafür ist das umgebende Zytokinmilieu. Auch hierbei kommen DC ins Spiel. Die Sekretion von Interleukinen -12, -23, -27 oder Typ-I-IFN, ebenso wie die Expression des membrangebundenen Adhäsionsmoleküls ICAM-1 (*intercellular adhesion molecule*) verursachen einen Shift hin zur zellulär geprägten Th1-Antwort. Th2-begünstigend ist möglicherweise die Produktion von IL-4, CCL2 (*chemokine ligand*) und die Expression des Transmembranmoleküls OX40L (CD134) durch aktivierte DC (de Jong et al. 2005).

Jedoch bereits ein Schritt davor, nämlich die Bindung des Pathogentyps über ihren jeweiligen PPR an die unreife DC könnte die Ausrichtung der Th1/Th2-Balance bahnen. So fördern DC zum Beispiel Th1-Antworten, wenn sie mit intrazellulären Pathogenen konfrontiert wurden, Helminthen hingegen führen zur Entwicklung von T2-Helferzellen (de Jong et al. 2002; Kalinski et al. 1999).

Darüber hinaus wird eine Beteiligung von verschiedenen Gewebsfaktoren diskutiert, die ebenfalls über Bindung an die dendritischen Zellen diese für eine definierte Immunausrichtung programmieren (Kapsenberg 2003).

1.3.7 Toleranz

Neben der potenten Stimulation von Immunantworten kommt den DC auch eine wesentliche Rolle in der Aufrechterhaltung immunologischer Toleranz gegenüber körpereigenen Antigenen zu.

Zusammengefasst geschieht die DC-vermittelte Induktion von Immuneffektorzellen durch zwei Signale: Die effektive Präsentation von Fremdantigen und gleichzeitige Vermittlung von kostimulatorischen Signalen an die Lymphozyten. Dieser duale Mechanismus ist essentiell, da unreife DC ihr umgebendes Milieu konstant durch Antigenaufnahme analysieren und so neben pathogenen Strukturen auch körpereigene Antigene aufnehmen, welche sie über MHC präsentieren. Dies sind zum Beispiel abgestorbene Zellen im Rahmen der physiologischen Zellerneuerung oder bestimmte Hitzeschockproteine, welche beim Zelltod entstehen. Da aber nicht alle autoreaktiven T-Zellen im Rahmen der Negativselektion im Thymus entfernt werden, droht so potentiell Autoimmunität mit Schädigung von körpereigenem Gewebe. Tatsächlich kommt es jedoch nur selten zu Autoimmunreaktionen bei einem Aufeinandertreffen von somatischem Autoantigen mit ihrer T-Zelle. Dafür verantwortliche scheinen sogenannte tolerogene DC sein (Munn 2002).

Eine mögliche Erklärung liefert hierfür das von P. Matzinger beschriebene »Gefahrenmodell«, (Matzinger 1994), welches davon ausgeht, dass die Aktivierung von APC bzw. DC über die Antigenbindung hinaus noch von speziell sezernierten Faktoren beschädigter Zellen abhängig ist. Diese können sowohl von bakteriell oder viral infizierten, als auch von entarteten Tumorzellen stammen (Matzinger 1998). Fehlen solche »Gefahren«-Signale, werden keine kostimulierenden Moleküle exprimiert, die DC werden tolerogen. Eine auf diese Weise über ihren TCR bindende T-Zelle wird nicht aktiviert, sondern verfällt in einen refraktären Zustand der Anergie, gekennzeichnet durch Proliferationsarrest und Einstellung der Zytokinproduktion respektive IL-2 (Schwartz 2003), oder aber die T-Zelle wird durch Apoptose deletiert (Steinman et al. 2003).

Periphere Toleranzinduktion unter Beteiligung von DC scheint noch auf einem anderen Wege möglich. Regulatorische T-Zellen (Tregs) stellen eine heterogene Gruppe von T-Lymphozyten dar, welche die Aktivierung des Immunsystems hemmen (Steinman et al. 2003). Vor allem geschieht dies vermittelt durch Sekretion der antiinflammatorischen Zytokine IL-10

und TGF- β (*transforming growth factor β*) und damit Unterdrückung von T-Effektorfunktionen (Sakaguchi et al. 2008). Verschiedene Studien belegen die Fähigkeit dendritischer Zellen, die Entwicklung von adaptiven Tregs hervorzurufen (de Jong et al. 2005).

Diese Toleranzmechanismen verhindern überschießende Angriffe auf intakte Körperzellen und unterbinden so Autoimmunität. Auf der anderen Seite kann eine notwendige Immunantwort beispielsweise gegen Tumore verhindert werden, wenn tolerogene oder regulatorische DC Fragmente entarteter Zellen präsentieren.

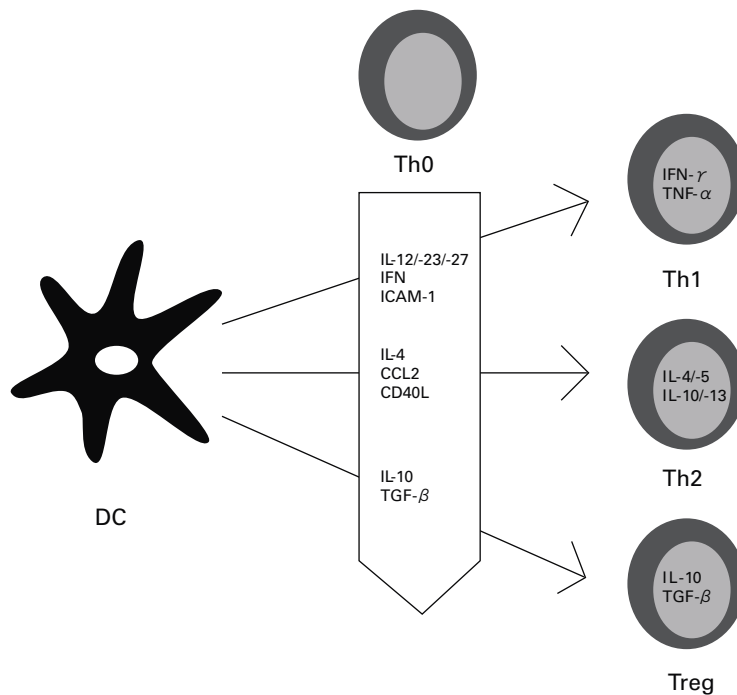


Abb. 4: Vereinfachtes Modell einer T-zellabhängigen Steuerung der Immunantwort

Abhängig vom sie umgebenden Zytokinmilieu kann über eine noch nicht determinierte T-Zelle (Th0) die Ausrichtung für die jeweils passende körperliche Immunantwort festgelegt werden. Die DC ist über die Freisetzung verschiedener Botenstoffe an dieser Immunbalance beteiligt (s. Balkenpfeil). Th1-Zellen setzen v.a. IFN- γ und TNF- α frei, welche durch Aktivierung von Makrophagen, CTL und Produktionsanregung opsonierender Antikörper die Abwehr auf zellulärer Ebene fördern. TH2-Zellen hingegen produzieren spezielle Interleukine (-4/-5/-10/-13) und regen damit die Antikörperproduktion von B-Zellen (humorales Abwehrsystem) an. Der Einfluss von IL-10 oder TGF- β aktiviert wiederum regulatorische T-Zellen (Tregs), welche ihrerseits über genannte Zytokine T-Effektorfunktionen hemmen und somit eine Immunantwort unterdrücken.

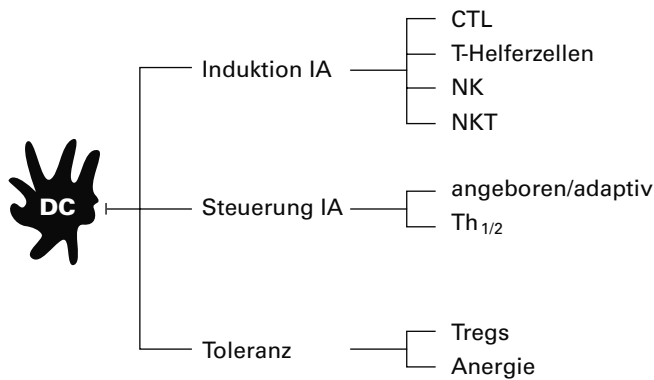


Abb. 5: Zusammenfassende Übersicht Aufgaben der dendritischen Zelle

DC aktivieren über Antigenpräsentation und / oder Sezernierung von Botenstoffen (Zytokine) verschiedene Zellen des Immunsystems und sind damit an der Generierung oder aber auch Unterdrückung (Toleranz durch anerge oder regulatorische T-Zellen) einer Immunantwort (IA) maßgeblich beteiligt. Zudem beeinflussen sie über den jeweiligen Zytokintyp die einzunehmende Richtung einer Immunantwort - angeborene unspezifische Mechanismen (z. B. Aktivierung NK) versus antigenspezifische Abwehr, repräsentiert durch T-Zellen und hier speziell Terminierung zwischen Th_{1/2} (s. vorangegangene Grafik Abb.4).

1.4 Zusammenschau und Fragestellung

Die derzeit unbefriedigenden systemtherapeutischen Möglichkeiten erfordern für das Ovarialkarzinom erweiterte Behandlungsstrategien um die therapeutische Effektivität zu verbessern. Immunologische Ansätze könnten auch hier vielversprechend sein. So wurde gezeigt, dass die Anwesenheit immunkompetenter dendritischer Zellen im Ovarialkarzinom mit einer besseren Prognose für die betroffenen Patientinnen behaftet ist (Eisenthal et al. 2001), wohingegen immunsuppressive Mechanismen mit höherer Sterblichkeit und verkürzten Überlebenszeiten einhergehen (Curiel et al. 2004).

Glykodelin ist ein Glykoprotein mit bekannten immunsuppressiven Eigenschaften. Seine Expression konnte auch in verschiedenen Tumoren nachgewiesen werden (Kamarainen et al. 1996; Horowitz et al. 2001; Kamarainen et al. 1999). Im Zusammenhang mit dem Ovarialkarzinom wird Glykodelin als potentiell tumorassoziiertes Antigen in derzeit laufenden Studien als Biomarker zur Früherkennung und Verlaufsbeobachtung des Ovarialkarzinoms erprobt (Havrilesky et al. 2008). Gd besitzt außerdem Angiogenese-fördernde Eigenschaften, was im Rahmen von Neovaskularisationsprozessen die Tumorgenese unterstützen könnte (Song et al. 2001).

Für Glykodelin sind ausgeprägte immunmodulatorische Effekte beschrieben. Dies gilt für verschiedene Zellen sowohl der angeborenen als auch der adaptiven Immunabwehr: Gd hemmt direkt die Effektorfunktion von T-Lymphozyten und Natürlichen Killerzellen (Rachmilewitz et al. 1999; Okamoto et al. 1991). Auch Monozyten/Makrophagen besitzen einen definierten Gd-Rezeptor und interagieren so mit dem Glykoprotein (Miller et

al. 1998). Die Wirkung von Glykodelin auf dendritische Zellen wurde bisher jedoch noch nicht untersucht. Jedoch sind dendritische Zellen zentral bedeutsame Immunregulatoren, die effektiv spezifische Immunantworten initiieren können, im Speziellen auch gegen Tumorantigene. Als tolerogene DC verhindern sie genau dies und können so die Tumorgene- se fördern. Damit stellen sie ein interessantes, bis dato noch unerforschtes Zielobjekt für dieses Glykodelin dar.

Daher soll in der vorliegenden Arbeit die Interaktion zwischen Glykodelin aus Ovarial- karzinomaszites und humanen moDC im Hinblick auf Veränderungen phänotypischer und funktionaler Charakteristika von DC untersucht werden.

Im Einzelnen wurde folgenden Fragestellungen nachgegangen:

Kann Aszites-Glykodelin den Aktivierungsstatus von DC beeinflussen?

Hierzu wurden folgende Merkmale betrachtet:

1. Phänotypische Veränderungen der DC
2. Endopinozytotische Aktivität der DC

Ergeben sich Veränderungen hinsichtlich ihrer immunstimulierenden Fähigkeiten?

Verifikation anhand Untersuchungen zum/zur

3. Sezernierten Zytokinprofil der DC
4. Lymphoproliferativen Aktivität der DC

2 Material und Methoden

2.1 Geräte und Reagenzien

2.1.1 Laborgeräte

Chromatographen	DEAE-Sepharose CL-6B-Säule, Oktyl-Sepharose CC-4B, Resource-Phe, Amersham Pharmacia Biotech AG (Uppsala, Schweden)
Durchflußzytometer	»FACS Calibur« Becton Dickinson (Heidelberg)
Eismaschine	Scotsman ®, Enodis GmbH (Herborn)
Elektrophorese	Power Supply Consort E815, Sigma-Aldrich (Steinheim)
Elektrophoresekammer	Mini-PROTEAN ® 3cell, Bio-Rad (München)
ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) Reader	MRX Dynatech LAB, 450 mm (Burlington, USA)
Magnetrührer	IKA-COMBIMAG RCH, IKA GmbH&Co KG (Staufen)
Photometer	Ultrospec™ 3100 pro, Amersham Biosciences GmbH (Freiburg)
Stickstofftank	LindeAG (München)
Thermoblock	Dri-Block ® DB-2A, Bibby Scientific Limited (Staffordshire, USA)
Waage	PM-460 Delta Range, Mettler Toledo (Giessen)
Wasserentsalzungsanlage	Millipore (Billerica, USA)
Zentrifugen	»Labofuge 2000« Heraeus Christ GmbH (Osterode) »Omnifuge 2.0 RS« Heraeus Sepatech GmbH (Osterode)

2.1.2 Chemikalien und sonstiges Verbrauchsmaterial

Ammoniumhydrogencarbonatpuffer (NH_4HCO_3)	>99%, M79, 0,6g/mol, Carl Roth GmbH&Co KG (Karlsruhe)
<i>Aqua ad iniectabilia</i>	Braun Melsungen AG, (Melsungen)
Natriumhydrogenphosphatmonohydrat (NaH_2PO_4)	99g/mol, Merck KGaA (Darmstadt)
Natronlauge	c(NaOH) 1mol/l(1N), Merck KGaA (Darmstadt)
TrizmaBase	Trizma ® Base, Sigma-Aldrich (Steinheim)
Tween 20	Bio-Rad (München)
24-well-Platten	Greiner (Frickenhausen)
6-well-Platten	Greiner (Frickenhausen)
Polypropylen-Röhrchen	Falcon™, Becton Dickinson (Heidelberg)
Dialysierschläuche	»Visking Typ 36/32« Carl Roth GmbH&Co KG (Karlsruhe)
Einmalkanülen	216 STERIKAN, Braun Melsungen AG (Melsungen)
Einwegspritzen	Ciscardt™, Braun Melsungen AG (Melsungen)
Kanülen	Microlance™, Becton Dickinson (Heidelberg)
Kryoröhrchen	NALGENE 2ml, Nalge Nunc, Thermo Fisher Scientific (Roskilde, Dänemark)
Kulturflaschen (175 cm ²)	Falcon Culture Flasks, Becton Dickinson (Heidelberg)
Mikroküvetten (10x4mm, Lichtweg 10nm)	Sarstedt AG & Co (Nümbrecht)
Nitrozellulosemembran	»Trans-Blot« Transfer Medium, Bio-Rad (München)
Sterilfilter	VYGON GmbH&Co KG (Aachen)
Ultrafiltrationsmembran	Regenerated Cellulose NMWL 10.000 YM 10 amicon Millipore (Billerica, USA)

2.1.3 Puffer, Medien, Seren, Lösungen

Milchpulver	500g Blotting Grade, Carl Roth GmbH&Co GK (Karlsruhe)
Diaminobenzidin (DAB)	DynaChrome™ DAB, Immunotech/Beckmann Coulter (Krefeld)
Bradford-Reagenz	Protein-Assay Farbstoff-Konz. (Nr. 500-0006), Bio-Rad (München)
Proteinstandards	Protein-Assay Standard II. (Nr. 500-00007), Bio-Rad (München)
Heparin	Heparin-Natrium 25.000I.E., Braun Melsungen AG (Melsungen)
Ficoll	L6115, Biochrom AG (Berlin)
Medium	RPMI Medium 1640, Biochrom AG (Berlin)
AB-Serum	E8008 Lonza, Bio Whittaker (St. Louis, USA)
Penicillin/Streptomycin	A2210, Biochrom AG (Berlin)
phosphate buffered saline (PBS)	Dulbecco w/o Ca ²⁺ /Mg ²⁺ low endotoxin, Biochrom AG (Berlin)
Fetal calf serum (FCS)	PAA Laboratories (Pasching, Österreich)

2.1.4 Reagenziensets

ELISA	Cell proliferation ELISA, BrdU (colorimetric), Roche (Mannheim)
Bromdesoxyuridin (BrdU)	Cell Proliferation ELISA, Roche (Mannheim)
Detektionskit	Vecastain ® Elite ABC-Kit-goat-IgG, Linaris GmbH (Dossenheim)
opt EIA human IL-10/IL-12 (p40)	Becton Dickinson (Heidelberg)

2.1.5 Chemokine und Zytokine

GM-CSF	Leukine ® Immunex Corporation (Seattle, USA)
IL-4	65591, Promega (Mannheim)
IL-1 β	Strathmann Biotech (Hannover)
LPS	Boehringer (Mannheim)
TNF- α	R&D Systems (Wiesbaden)

2.1.6 Antikörper

CD14	antiCD14 APC (555399), Becton Dickinson (San Diego, USA)
CD83	PE anti-human CD83 (556855), Becton Dickinson (San Diego, USA)
CD86	PE-Cy5 anti-human CD86 (555666), Becton Dickinson (San Diego, USA)
DC-SIGN	PE anti-human DC-SIGN (551265), Becton Dickinson (San Diego, USA)
Fluoresceinisothiocyanat (FITC)-Dextran	500.000 Conjugate, Sigma-Aldrich (Steinheim)
Gd-Primärantikörper	Glykodelin Klon C15 (sc 12291), Q13 (sc12290), Santa Cruz Biotechnology (Heidelberg),
Humane Leukozytenantigene (HLA)-DR PerCP (Peridinin Chlorophyll Protein Complex)	antiHLA-DR PerCP (347402), Becton Dickinson (San Diego, USA)

2.2 Aufbereitung der Analysekomponenten

2.2.1 Aufreinigung von Glykodelin aus Ovarialkarzinomaszites

Glykodelin wurde aus gepoolter Aszitesflüssigkeit von Ovarialkarzinompatientinnen durch verschiedene, im Folgenden detailliert beschriebene Verfahrensschritte aufgereinigt (Reimer et al. 2000, Jeschke et al. 2005). Alle Aszitesproben stammten von Patientinnen, die sich aus medizinischer Indikation einer Punktion unterzogen und der Verwendung dieser Proben zu Forschungszwecken zugestimmt hatten. Eine Genehmigung zur Gewinnung und Verarbeitung des Humanmaterials durch die Ethikkommission der medizinischen Fakultät der LMU lag ebenfalls vor.

2.2.1.1 Chromatografie

Allgemeines Funktionsprinzip

Die Chromatografie ist ein chemisches Verfahren zur Aufteilung von Stoffgemischen. Die Grundlage stellen Wechselwirkungen zwischen einer unbeweglichen (stationären) Phase und den Komponenten einer beweglichen (mobilen) Phase. Die zu separierende Probe wird dabei in einer mobilen Phase an der stationären Phase vorbeigeleitet.

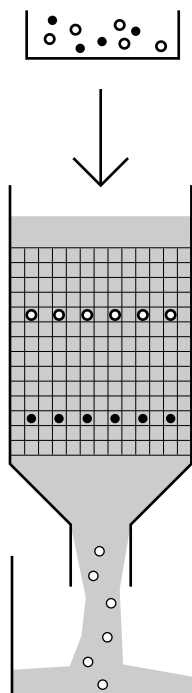


Abb. 6: Schematische Darstellung Chromatografieprinzip

Zur chemischen Auftrennung eines Stoffgemisches wird die zu separierende Probe in einer mobilen Phase (Flüssigkeit, beispielsweise Wasser) auf einer sogenannten stationären Phase (z.B. Gelmatrix) befördert. Aufgrund verschiedenster Wechselwirkungen zwischen Probe, mobiler und stationärer Phase können einzelne Substanzen voneinander getrennt werden.

Aufgrund der Interaktionen zwischen der Probe und den verschiedenen Phasen werden einzelne Bestandteile unterschiedlich schnell weitertransportiert und somit voneinander getrennt. Die charakteristischen Passagezeiten ermöglichen damit Rückschlüsse auf die jeweiligen Substanzen.

Des Weiteren können durch die Zugabe von sogenannten Elutionsmitteln adsorbierte Stoffe gezielt aus ihrer Bindung gelöst und damit detektiert werden. Man kann die verschiedenen Chromatografieverfahren einteilen anhand der genutzten physikalisch-chemischen Trennprinzipien (beispielsweise Ionenaustausch, hydrophobe Interaktionen, Größentrennung durch Siebfunktionen wie beispielsweise Gelfiltration) und der verwendeten Phasen (z. B. Flüssigkeits- oder Gaschromatografien).

Zur Isolation von Glykodelin aus der Aszitesflüssigkeit wurde die FPLC (*fast protein liquid chromatography*) verwandt. Bei der FPLC handelt es sich um eine Flüssigkeitschromatografie, welche sich zur Aufreinigung von Proteinen aus Stoffgemischen eignet und deren vorgefertigte Säulen als stationäre Phase kleine beschichtete Matrixkügelchen nutzen. Dadurch vergrößert sich die Interaktionsfläche zwischen Probe und Phasen und das Auflösungsvermögen des Systems steigt. Allerdings müssen für angemessene Durchflussraten höhere Drücke als bei anderen Verfahren aufgewandt werden.

Verfahren Schritt für Schritt

Die Aszitesflüssigkeit wurde zur Reinigung von niedermolekularen Substanzen drei Mal gegen destilliertes Wasser dialysiert und im Anschluss daran zentrifugiert (3000/min, 10 min). Der Überstand wurde filtriert und danach mit 50mM NH_4HCO_3 gepuffert. Anschließend erfolgte eine erste Chromatografie mittels Anionenaustausch – FPLC. Hierbei wurde das Probenmaterial auf eine DEAE-Sepharose-Säule gepumpt (DEAE = Diethylaminoethylcellulose, ein schwach basischer Anionenaustauscher). Die Elution der jeweiligen Fraktionen erfolgte bei einem linearen Gradienten von 50 – 500mM Ammoniumhydrogencarbonatpuffer mit einer Flussrate von 2ml/min.

Die Substanzen, die von der chromatografischen Säule eluiert werden, erzeugen in einem speziellen Detektor Signale. Es existieren verschiedene Detektionssysteme, beispielsweise nutzt man physikalischen Eigenschaften wie Licht, Fluoreszenz, Wärmeleitung, oder aber man erhält Signale in Form chemischer Reaktionen (beispielsweise Färbeprozesse). Diese kontinuierlich detektierten Messwerte werden über einen Schreiber in Form einer Kurve, dem Chromatogramm, visualisiert. Dabei wird die Konzentration einzelner Komponenten in Abhängigkeit zur Laufzeit dargestellt. Einzelerhebungen werden als Peaks bezeichnet, die Fläche unter dem Peak ist proportional der Stoffkonzentration. Zwischen zwei Peaks erzeugt die mobile Phase das Basisliniensignal. Peakerkennung und -integration (Suchen von Peaks mit entsprechenden mathematischen Verfahren und Berechnung von Peakhöhe, -fläche, Retentionszeit bzw. Laufstrecke am Maximum, etc.) erfolgt durch spezielle Analysensysteme auf Computer-Basis. Die Retentionszeit entspricht dabei der Zeit, die Moleküle eines reinen Stoffes zum Durchwandern der Säule benötigen und ist in diesem Zusammenhang bedeutend, da ein bestimmtes Protein anhand seiner spezifischen Retentionszeit identifiziert werden kann.

Zur Identifikation der Glykodelin-haltigen Fraktion wurde die *Dot-Blot-Methode* (s. Punkt 2.2.1.3) angewandt. Hierzu wurden jeweils 5µl aller Elutionsproben punktförmig auf eine Nitrozellulosemembran aufgetragen. In einem immunhistochemischen Sandwich-Verfahren erfolgt die Detektion glykodelinhaltiger Dots.

Die entsprechenden Proben wurden zusammengeführt (gepoolt), erneut dialysiert, im Anschluss daran mit 10mM Natriumhydrogencarbonat (NaH_2PO_4) gepuffert und durch Titration mit Natronlauge (1N) auf einen pH-Wert von 8,0 eingestellt.

Im nächsten Reinigungsschritt erfolgte eine hydrophobe Interaktionschromatografie. Dabei wurde eine Oktyl-Sepharose – Säule mit dem Proteingemisch beladen. Die Eluierung geschah bei einem linearen Gradienten von 0 – 50% durch einen Zweikomponenten-Puffer (50% Isopropanol und 50% Natriumhydrogenphosphat 10mM, pH 8,0).

Durch einen erneuten Dot-Blot ließ sich die Proteinmischung weiter eingrenzen.

Nach einer weiteren Dialyse wurden im finalen Chromatografieschritt erneut hydrophobe Wechselwirkungen genutzt (Resource Phe). Die Säule wurde mit 10mM Natriumhydrogenphosphat pH 8,0 voräquilibriert. Nach Probenaufladung eluierten die jeweiligen Fraktionen über einen linearen Gradienten von 0 – 50% Isopropanol in 10mM Natriumhydrogenphosphat (Durchflussrate 2ml/min).

Auf die Dialyse folgte nun die *Ultrafiltration*.

2.2.1.2 Ultrafiltration

Das Prinzip dieser Technik besteht in der Abtrennung makromolekularer Substanzen unter gleichzeitiger Aufkonzentration derselben. Durch eine Membran werden Moleküle eines bestimmten Molekulargewichts gepresst, hierzu wird eine Rührzellenkammer unter Druck gesetzt (circa 3mbar Stickstoff). Die Porengröße wurde so gewählt, das Glykodelin (MW 28 kDa) nicht passieren kann. Bei einem Restvolumen von 1ml wurde die Proteineinengung gestoppt und das gewonnene Konzentrat vorsichtig abpipettiert. Durch zweimaliges Spülen der Membran mit Puffer (NaHCO_3 10mM mit NaCl 100mM, pH 8,0) wurden weitere, nunmehr verdünnte Proteinmengen gewonnen und ein Verlust von membranhaftendem Protein vermieden.

Der abschließende Schritt bestand in der sterilen Filtration der so gewonnenen Proteinkonzentration zur Verhinderung von Kontaminationen. Die Aufbewahrung bis zur Verwendung erfolgte in Kühlung bei 4°C.

2.2.1.3 Dot-Blot

Bei dieser Methode handelt es sich um ein immunologisches Mehrschrittverfahren, indem färbereich die Anwesenheit von bestimmten Proteinen nachgewiesen werden kann. Dazu wird ein Proteingemisch irreversibel auf einen Filter (in der Regel handelt es sich um Nitrozellulose) fixiert (= blotten). Diese wird zur Blockade ungesättigter Proteinbindungsstellen mindestens eine Stunde mit einer Milchpulverlösung angesetzt. Danach wird der in Milchpulverlösung verdünnte IgG-Primärantikörper aus der Ziege gegen die Glykodelinproteinsequenz „C15“ für mindestens 1,5 Stunden zugegeben. Das folgende Prozedere nutzt die ABC-Methode (Avidin-Biotin-Komplex, s. folgende Abb. 4): Ein biotinylierter Sekundärantikörper bindet als sogenannter Brückenantikörper an anti-Glykodelin C15. Ein Streptavidin – Molekül (Protein aus *Streptomyces avidinii*) bindet mit hoher Affinität jeweils 3 Biotine. Dieser Schritt dient damit als Signalverstärker. Gleichmaßen ist Biotin Peroxidase-gekoppelt. Dieses Enzym bildet zusammen mit Wasserstoffperoxid als Katalysator und einem Chromogen (hier DAB = Diaaminobenzidin) ein stabiles farbiges Endprodukt. Die Inkubationen erfolgen jeweils bei Raumtemperatur unter leichter Schüttelbewegung mit anschließender PBS-Waschung zur Entfernung ungebundener Antikörper.

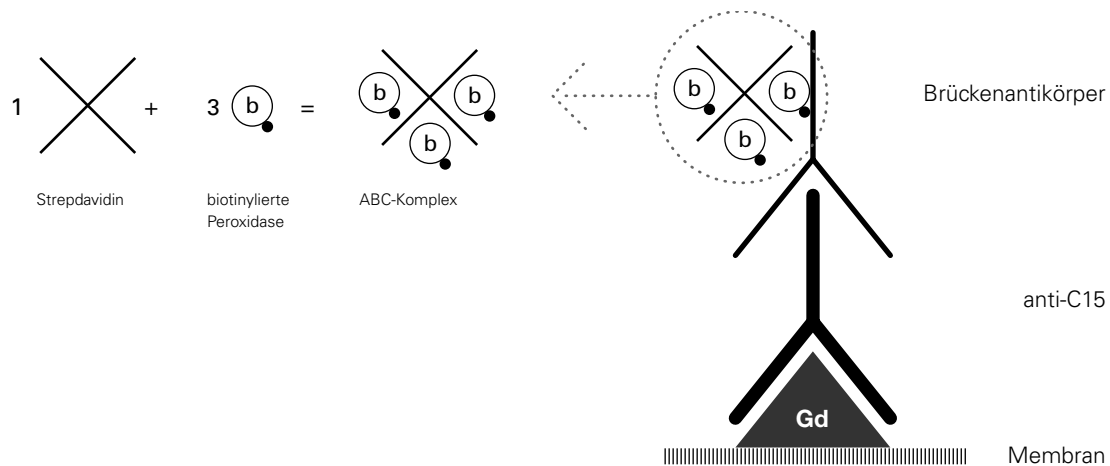


Abb. 7: Sandwichprinzip immunhistochemischer Färbung

Eine Nitrozellulosemembran, welche mit gebundenem Protein (hier Glykodelin) bestückt ist, wird mit einem Glykodelin-Antikörper („C15“) inkubiert. In den nächsten Arbeitsschritten bindet hieran ein biotinylierter Brückenantikörper, welcher wiederum durch Verbindung mit einem Streptavidinmolekül und abschließender enzymgekoppelter (Peroxidase) Farbreaktion zum Sichtbarwerden des zu bestimmenden Glykodelins führt.

2.2.1.4 Konzentrationsbestimmung mittels Proteinassay nach Bradford

Die Ermittlung der Glykodelinkonzentration in den jeweiligen Proben erfolgte mittels eines Bradford-Tests. Dabei handelt es sich um eine empfindliche photometrische Methode zur semiquantitativen Bestimmung von Proteinen. Der Farbstoff Coomassie-Brillant-Blau G-250 im Bradfordreagenz geht in saurer Lösung sowohl mit kationischen als auch den nichtpolaren, hydrophoben Seitenketten von Proteinen eine Komplexbildung ein. Das Absorptionsspektrum des freien, roten Farbstoffes liegt bei 470 nm Absorptionsmaximum. Durch die Komplexbildung mit Proteinen wird er jedoch in seiner blauen Sulfatform stabilisiert, das Absorptionsspektrum verschiebt sich auf ein Maximum bei 595 nm. Der Extinktionskoeffizient des Farbstoff-Protein-Komplexes liegt außerdem sehr viel höher als der des freien Farbstoffes. Somit kann die Zunahme der Absorption bei einer Wellenlänge von 595 nm photometrisch gemessen werden und gilt als Maß für die Proteinkonzentration der Probelösung. Da jedoch das Ausmaß der Farbreaktion von Protein zu Protein unterschiedlich ist, wird ein sogenanntes Standardprotein in Verdünnungsreihe zur Kalibrierung eingesetzt.

2.2.1.5 Identifikation durch Westernblot

Methodenprinzip

Diese Methode ermöglicht die Identifizierung und in beschränktem Maße auch die Quantifizierung spezifischer Proteine innerhalb eines Proteingemisches. Dazu werden elektrophoretisch aufgetrennte Proteine aus einem Trenngel auf eine Trägermembran übertragen (sog. *Blotting* / *Blotten*), dort fixiert und können anschließend anhand geeigneter Analyseverfahren identifiziert werden.

Die Proteinauftrennung nach Banden geschieht in Gelelektrophoresetechnik. Das Proteingemisch wird hierzu auf einer geeigneten Trägermatrix (z.B. SDS-PAGE) entsprechend ihrer Größe und Ladung separiert. Für den eigentlichen Blot-Vorgang wird ein senkrecht zum Polyacrylamid-Gel gerichtetes elektrisches Feld angelegt. Die Proteine wandern aus dem Gel auf eine Membran (z.B. PVDF = Polyvinylidenfluorid) und bleiben dort an der Oberfläche aufgrund hydrophober Wechselwirkungen haften. Das ursprünglich im Gel erhaltene Trennmuster bleibt nach dem Blotting erhalten, so dass man eine exakte Replik des ursprünglichen Gels erhält – die Proteine sind nun aber für weitere Methoden wie etwa Antikörper-Bindung zugänglich und lassen sich somit zuordnen.

Praktisches Vorgehen

Zunächst erfolgte die Vorbereitung der Analysate. Die eingesetzte Proteinmenge betrug 5000 ng. Das gesamte Probevolumen beträgt 20µl und setzt sich zusammen aus 5µl Probenpuffer (Mercaptoethanol mit Farbreagenz, welcher die Proteine denaturiert und im Well absinken lässt) dem errechneten Einsatzvolumen an Protein und der entsprechenden Restmenge an destilliertem Wasser. Vor ihrem Einsatz wurden die Proben noch bei 95° C für 5 Minuten im Thermoblock denaturiert, anschließend 15 Minuten im Kühlschrank abgekühlt, sowie dann für wenige Sekunden abzentrifugiert. Nun erfolgte die Auftrennung mittels Gelelektrophorese. Dazu wurde ein separater Kammereinsatz (dieser enthält das vorbereitete Gel und einen als Buffer-Dummy bezeichneten Platzhalter) in einer Elektrophorese-Kammer plziert und diese innere Kammer komplett mit Laufpuffer (100ml Tris/Glycine/SDS Puffer plus 900ml Aquadest) aufgefüllt. Die äußere Kammer enthält ebenfalls den Puffer. Ein Plastikkamm, welcher die Geltaschen formt, wurde aus dem Gel entfernt und die so entstandenen Gel-Wells mit 100µl Laufpuffer gespült und anschließend mit den Proben (18 – 20µl) sowie der Positivkontrolle (Proteinstandard 7µl) bestückt. Eine Stromspannung von 80 V für 30 Minuten, dann 100 V für weitere 1 – 1,5 Stunden wurde angelegt, bis die Lauffront das Gelende erreicht hatte.

Im nächsten Schritt mussten nun die aufgetrennten Proteinbanden auf eine Membran geblottet werden. Dazu wurde die Gelkammer eröffnet, das Gel luftblasenfrei auf Filterpapier umgelegt und mit in Methanol vorbehandelter PVDF-Membran bedeckt. Beidseitig umhüllt von Filterpapier und Fiberpads wurde das Gel in einer Klemmkammer erneut in die innere Blotkammer eingehängt. Diese wurde vollständig mit Blotpuffer aufgefüllt (100ml Tris/Glycine-Puffer mit 200ml Methanol und 700ml Aquadest) und zusammen mit einem Kühlelement in die äußere Blotkammer gehängt. Bei 0° C erfolgte das Blotting mit 100 V für 90 Minuten.

Nach Ablauf des Blotvorganges wurde die Membran der Kammer entnommen und für mindestens 2 Stunden (oder über Nacht) blockiert (5% Milchpulver in PBS mit 1 % Tween). Die Detektion des Westernblots erfolgt ähnlich dem Dot-Blot immunhistochemisch im Sandwich-Verfahren, ebenfalls mithilfe des polyklonalen Glykodelin-Primärantikörpers sowie unter Zuhilfenahme des Enzyms Alkalische Phosphatase und des Farbstoffes BCIP/NBT (*5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate* als Enzymsubstrat; *nitro blue tetrazolium* stellt das zugehörige Oxidationsmittel). Im letzten Schritt sorgt dieser durch einen violetten Farbumschlag für das Sichtbarwerden der Proteinbanden.

2.2.1.6 Ausschuß von Probenverunreinigung

Als Qualitätskontrolle zum Ausschluss von Endotoxinverunreinigung wurden Chargen des aufgereinigten Glykodelins zusammen mit PBMC (*Peripheral Blood Mononuclear Cell*, d.h. Lymphozyten und Monozyten) inkubiert und die TNF- α – Konzentration im Überstand bestimmt.

2.2.2 Generierung dendritischer Zellen

2.2.2.1 Gewinnung mononukleärer Zellen

Dazu wurden 100ml peripher-venöses Blut von freiwilligen, gesunden Spendern (beiderlei Geschlechts, Alter 20 – 48 Jahre) gewonnen, mit 5000 I.E. Heparin antikoaguliert und durch Zugabe von 40% PBS vorsichtig gemischt. Das so verdünnte Blut wurde nun über eine kohlehydratreiche polymere Lösung (Ficoll Hypaque, spezifisches Gewicht 1.078) geschichtet (je 30ml Blut auf eine Grundlage von 15ml Ficoll) und ohne Bremse zentrifugiert (20 min, 1000g, bei Raumtemperatur). Erythrozyten und polymorphnukleare Leukozyten bzw. Granulozyten besitzen eine höhere spezifische Dichte als Ficoll und fallen durch das Polymernetz, während die mononukleären Zellen einen Ring oberhalb des Ficoll-Bandes bilden und so vorsichtig abgesaugt werden können. In drei anschließenden Waschschritten (Resuspension der Zellpellets in PBS, Poolen der Zellsuspensionen und anschließende Zentrifugation) wurden die gewonnenen Zellen von überflüssigen Plasmabestandteilen, Thrombozyten und zytotoxischen Ficollresten gereinigt.

Zur Abtrennung der Lymphozytenfraktion wurde das Zellpellet in 10 ml Medium resuspendiert (500ml RPMI Medium mit 1% Penicillin/Streptomycin, 1% L-Glutamin und 2% AB-Serum versetzt) und auf zwei 175cm² Kulturflaschen unter Zusatz von jeweils 15ml Medium verteilt. Diese Flaschen wurden 1 Stunde im Brutschrank (Brutschrankbedingungen im Folgenden 37° C und 5% CO₂) inkubiert. In diesem Zeitfenster adhären die Monozyten am Flaschenboden, während die meisten Lymphozyten im Medium verbleiben und so abgesaugt werden können. Um die Reinheit der Monozyten zu erhöhen, da auch einige Lymphozyten zunächst haften können, wurden die verbleibenden adhären Zellen mithilfe von PBS zweimal gewaschen und dabei durch horizontales Schwenken der Kulturflaschen zusätzlich Scherkräften ausgesetzt.

Für weitere 24 Stunden wurden die Monozyten in jeweils 20ml Medium im Brutschrank inkubiert. Innerhalb dieses Zeitraums lösten sich die initial adhären Zellen wieder. Die vollständige Zellablösung wurde manuell unterstützt durch zweimaliges Waschen mit kaltem PBS und Einsatz von Zellschabern, die vorsichtig am Flaschenboden hin- und her bewegt wurden. Medium und Wasch-PBS wurden aufgenommen, zentrifugiert (10min, 300g, 4° C) und das Pellet anschließend schonend in 1ml Medium resuspendiert. Eine Zellzählung erfolgte lichtmikroskopisch mithilfe einer Neubauer-Zählkammer unter Vitalfärbung mit Trypanblau (s. 2.4.1)

2.2.2.2 Ausreifung zu monozytenabgeleiteten dendritischen Zellen

Für die DC-Kultur wurden anschließend in eine 6-Well-Platte pro Well 2 Millionen Zellen in 2 ml Vollmedium ausgesät und unter Zugabe der Wachstumsfaktoren IL-4 (500 U/ml) und GM-CSF (1000 U/ml) für 6 Tage im Brutschrank ohne Medienwechsel inkubiert. Während dieser Zeitspanne reifen die Monozyten zu unstimulierten DC heran.

2.2.2.3 Lymphozytenanreicherung

PBMC, welche nach oben beschriebener, 60-minütiger Inkubation nicht in den Kulturflaschen adhärirten, konnten im Überstand entnommen und durchflusszytometrisch analysiert werden.

2.3 Kultur monozytenabgeleiteter dendritischer Zellen mit Glykodelin und/oder Reifestimulatoren

Nach 6-tägiger Inkubationszeit mit IL-4 und GM-CSF wurde zunächst der Medienüberstand abpipettiert, dann je Well 0,5ml frisches Medium zugegeben, mithilfe von Zellschabern gelöst und erneut mit 0,5ml Medium nachgespült. Die so gewonnene Zellsuspension wurde wiederum einer Zellzählung unterzogen und die moDC dann in 24-Well-Platten in einer Zellzahl von 100.000 bis maximal 500.000 pro Well, ausgesät.

Die Glykodelin-Zugabe erfolgte in Form von Konzentrationsreihen (50 µg, 25 µg, 10 µg, 5 µg, 1µg) in die Wells, die entsprechend einem Gesamtvolumen von 1ml dann mit Medium aufgefüllt wurden. Als Positivkontrollen dienten reine moDc, ohne Glykodelinzugabe, angesetzt mit der Standardkombination IL-1 β (10 ng/ml) und TNF- α (1000 U/ml) als Reifungsinduktoren, als Negativkontrollen nur alleinige moDC, beide ebenfalls mit Medium zu einem Endvolumen von 1ml/Well versetzt. Die Testreihen wurden für 48 Stunden im Brutschrank inkubiert.

Versuchsreihen mit Glykodelin und Reifungsinduktoren konnten erreicht werden, indem nach 24 Stunden zusätzlich zu den Glykodelinansätzen die entsprechenden Reifestimuli hinzu gegeben und weiter inkubiert wurden.

Nach 48-stündiger Gesaminkubationszeit wurden zunächst jeweils 200-400µl des Medienüberstandes abpipettiert und für spätere Zytokinbestimmungen bei -20° C eingefroren.

Die DC wurden im Restmedium mithilfe repetitiver Pipettiermanöver schonend gemischt und konnten nun zu Auswertungszwecken aufgenommen werden. Je nach anschließendem Analyseverfahren erfolgte dann dementsprechend die Weiterbearbeitung.

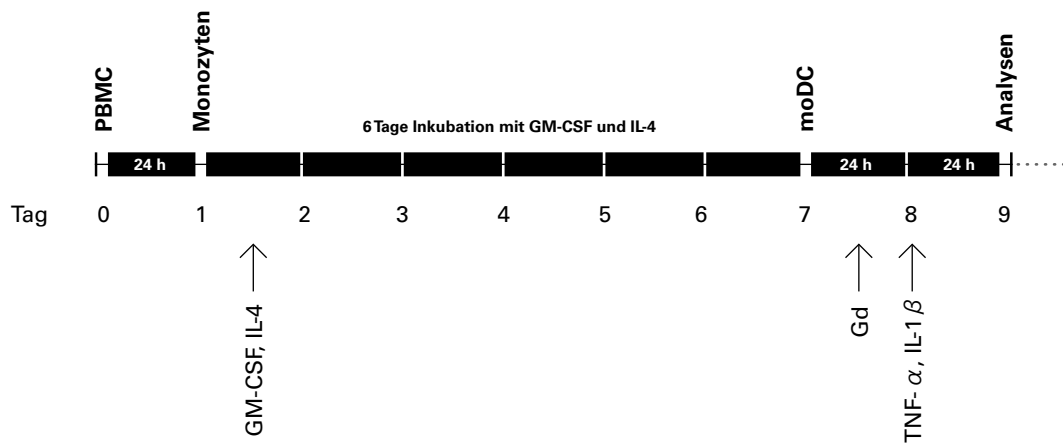


Abb. 8: Übersicht Zeitplan Generierung moDC und Stimulation mit TNF- α /IL-1 β bzw. Gd

Aus PBMC d.h. mononukleären Zellen des peripheren Blutes (Lymphozyten/Monozyten) welche durch ein spezielles Auftrennungsverfahren (s.2.2.2.1) aus Vollblut gewonnen wurden, lassen sich nach 24 Stunden Inkubation im Brutschrank adhärenente Monozyten isolieren. In der Zellkultur über 6 Tage nach Zugabe der Wachstumsfaktoren GM-CSF und IL-4 reifen diese zu unstimulierten moDC heran. Durch Zugabe von Glykodelin und/oder den Reifungsinduktoren TNF- α /IL-1 β entstehen so DC als Ausgangsprodukte zur weiteren Analyse in unterschiedlichen Testverfahren.

2.4 Analyseverfahren

2.4.1 Phasenkontrastmikroskopie

Allgemeines Funktionsprinzip

Dieses Mikroskopieverfahren wird routinemäßig in der Lichtmikroskopie zur optischen Darstellung biologischer Objekte genutzt. Dabei macht man sich den Umstand zunutze, dass sich Licht in Medien verschiedener Lichtbrechungsindizes mit unterschiedlicher Geschwindigkeit ausbreitet. So ergibt sich beim Durchlaufen eines Objekts, welches optisch dichter ist (d.h. einen höheren Brechungsindex besitzt z.B. Plasmamembranen / Zellkerne), als seine Umgebung, ein Phasenunterschied gegenüber dem Umgebungslicht (Hintergrundlicht). In den Strahlengang eingebrachte Polarisationsfilter wandeln diese Phasenunterschiede in Helligkeitsdifferenzen um, wodurch die beobachteten Strukturen in einem stärkeren Kontrast erscheinen.

Morphologische Beurteilung

Auf diese Weise untersuchte Zellen wurden anschließend photographisch dokumentiert und bezüglich etwaiger morphologischer Veränderungen, entsprechend ihres jeweiligen Reifestatus, beurteilt.

Vitalitätsstatus und Zellzahl

Die Vitalität der zu zählenden Zellen wird durch Zugabe von Trypanblau (Verhältnis Probe/ Farbstoff 1:10) überprüft. Dabei handelt es sich um einen sauren Farbstoff, des-

sen Anionen an Zellproteine binden. Tote Zellen inkorporieren den Farbstoff über ihre defekte Zellmembran und imponieren so tiefblau, lebende Zellen hingegen nehmen die Substanz nicht auf und erscheinen unter dem Mikroskop leuchtend hell. Die Zählung und Berechnung der Zellen erfolgte mithilfe einer Neubauer-Zählkammer.

2.4.2 Durchflusszytometrische Analyse von Oberflächenmarkern

Allgemeines Funktionsprinzip

Das sogenannte FACS-Verfahren (*Fluorescence activated cell sorting*) bietet die Möglichkeit, Zellen anhand von verschiedenen Eigenschaften wie Größe, Struktur, Oberflächenantigenen oder intrazellulärer Zusammensetzung zu unterscheiden. Dazu werden die Zellen mit Antikörpern gegen bestimmte zelluläre Strukturen markiert, welche mit einem Fluoreszenzfarbstoff von definierter Wellenlänge gekoppelt sind. Die einzelnen Zellen passieren nacheinander in einem laminaren Flüssigkeitsstrom einen fokussierten Laserstrahl (Argon mit der Wellenlänge von 488nm). Dieser regt die Chromophoren der Antikörper an, welche daraufhin Licht einer charakteristischen Wellenlänge emittieren. Dieses Licht wird durch spezielle Filter nach Wellenlängenbereichen sortiert und zu verschiedenen Detektoren gelenkt (Photomultiplier).

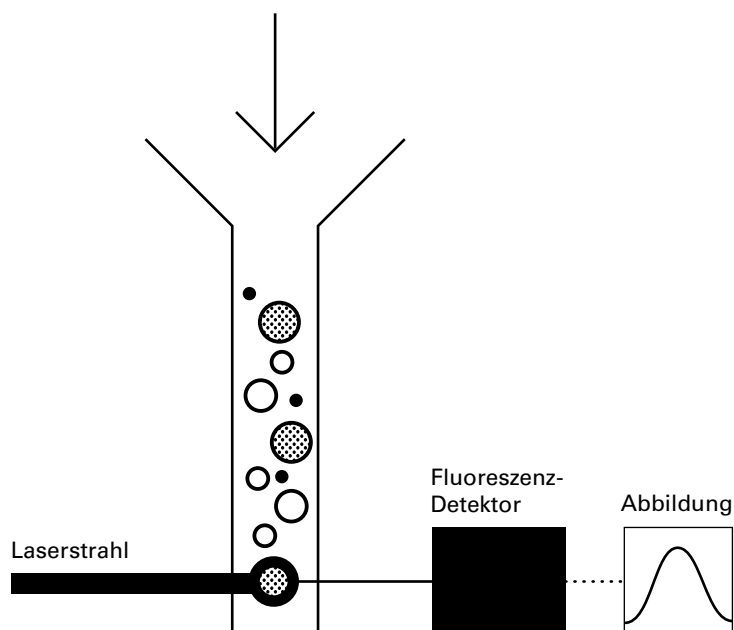


Abb. 9: Vereinfachte Darstellung Gerätprinzip FACS

Die zu untersuchenden Zellen passieren in einem laminaren Flüssigkeitsstrom einen fokussierten Laserstrahl, welcher Chromophoren zellgekoppelter Antikörper zur Lichtemission anregt. Jeder Farbstoff besitzt eine charakteristische Wellenlänge, die von speziellen Detektoren wahrgenommen wird.

Jedem Fluoreszenzfarbstoff wird somit ein spezifisches Signal zugeordnet und gleichzeitig eine Mehrfarbenanalyse ermöglicht. Die Intensität der gemessenen Fluoreszenz ist proportional zur Anzahl der gebundenen Antikörper pro Zelle und damit auch der Anzahl der untersuchten Strukturen.

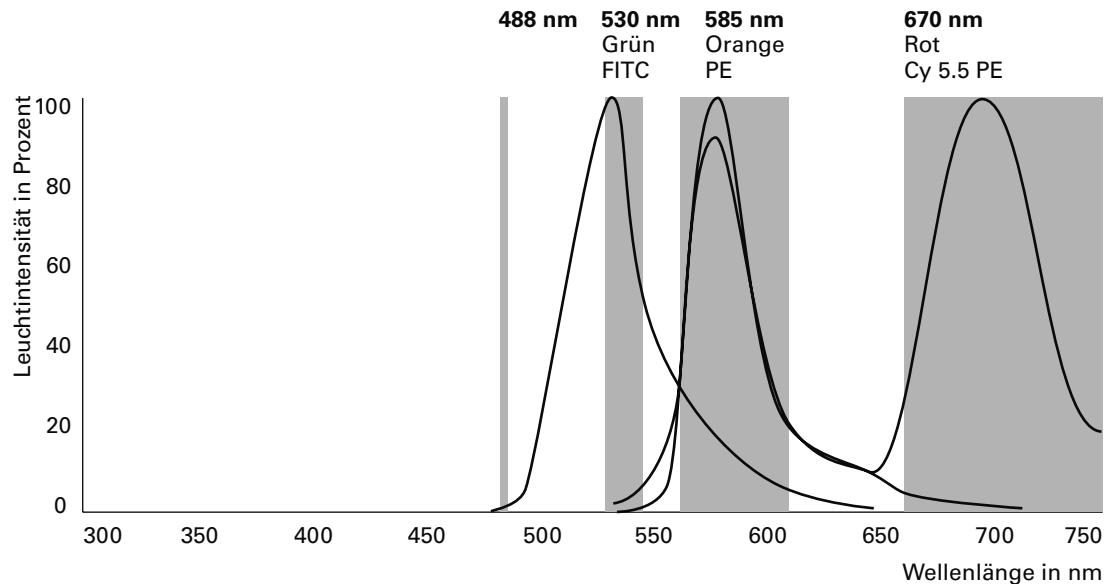


Abb. 10: Fluoreszenzspektrum verwendeter Farben im FACS

Gezeigt werden ausgewählte Farbstoffe (FITC=Fluoresceinisothiocyanat, PE=Phycoerythrin, Cy 5.5 PE=Phycoerythrin + Zyanid) mit den für sie charakteristischen Wellenlängen sowie sichtbarem Farbspektrum.

Unabhängig von den gekoppelten Farbstoffen kann außerdem eine Aussage über die Größe und Granularität der Zellen getroffen werden: Im Probenstrom enthaltene Bestandteile streuen das auftreffende Licht. Nach vorne abgelenkte Strahlen sind ein Maß für die Größe der gemessenen Zellen (Vorwärtstreulicht oder FSC = *Forward Scatter*). Das in einem Winkel von 90° abgestrahlte Seitwärtstreulicht (SSC = *Sidescatter*) dient als Maß für die Zellgranularität.

Die optischen Signale werden von einem Computer graphisch ausgewertet und in so genannten Punktwolkenhistogrammen (Dot-Plot) durch Korrelation zweier Parameter dargestellt. Anhand ihrer morphologischen Eigenschaften kann die interessierende Zellpopulation im Streulicht-Dot-Plot identifiziert werden (s. Abb. 11, linker Bildteil). Durch Eingrenzung von Zellen (sog. *gaten*) können dann gezielt diese ausgewählt und im Fluoreszenz-Dot-Plot beliebiger Eigenschaftsanalysen unterzogen werden (s. Abb. 11, rechter Bildabschnitt).

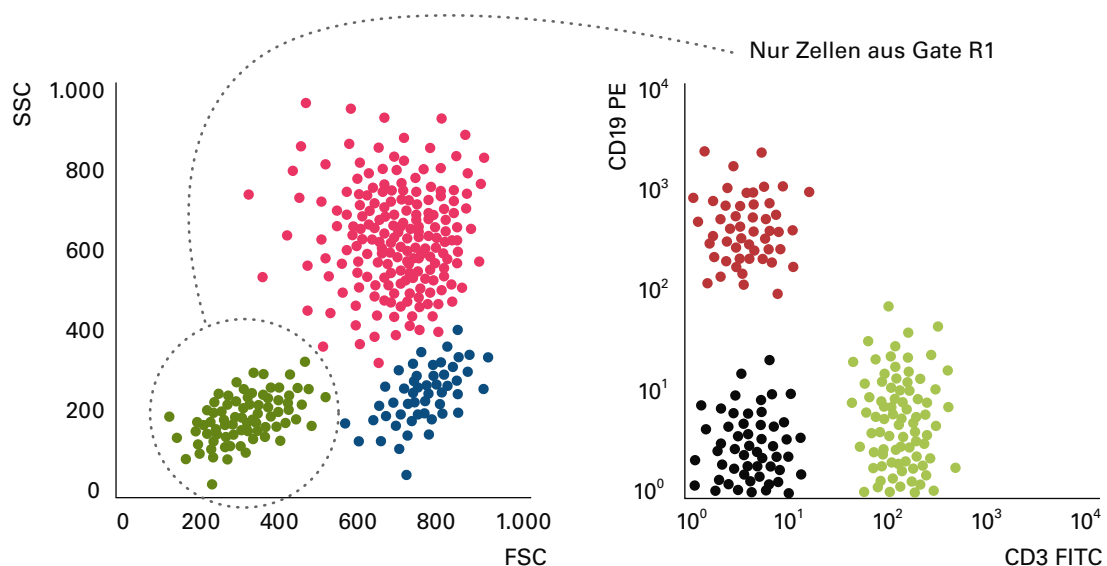


Abb. 11: Vereinfachte Darstellung Punktwolkenhistogramme (Dotplot)

Die graphische Auswertung optischer Signale aus dem FACS-Verfahren erfolgt in sogenannten Dotplots. Hier kommen jeweils 2 Parameter korreliert zur Darstellung. Im linken Bildteil zu sehen ist eine Aufteilung nach Zellgröße - getroffen anhand des Vorwärtstestreulichtes (FSC)- und Zellgranularität (entsprechend dem entstandenen Seitwärtstestreulicht, SSC). Im rechten Bildabschnitt dargestellt ist eine differenzierte Oberflächenmarkeranalyse mittels Farbkopplung einer vordefinierten Zellpopulation (R1).

Oberflächenmarkeranalyse

In den vorliegenden Experimenten wurde durch FACS-Analysen die Expression von ausgesuchten Oberflächenmarkern (CD-Molekülen) auf moDC/Monozyten in verschiedenen Versuchsanordnungen geprüft.

Für die jeweiligen Analysen wurden 20.000 zu testende Zellen je Polystyrol-Teströhrchen pipettiert. Anschließend erfolgte eine einmalige Waschung mit FACS-Puffer (PBS mit 5% FCS). Nach dem Zentrifugationsvorgang (7min, 400g, 4°C) wurde der Pufferüberstand mit einer Wasserstrahlunterdruckdüse bis auf ein Restvolumen von ca. 100µl entfernt. Die Zugabe von jeweils 10µl Antikörperreagenz (Maus-anti-Mensch) erfolgte unter Probenlagerung auf Eis um unspezifische Bindungsvorgänge zu minimieren.

Als Farbstoffe für die gekoppelten Antikörper fanden Verwendung FITC-(*Fluorescein-isothiocyanat*), PE-(*Phycoerythrin*), Cy5-PE (Farbstoffkonjugat aus *Phycoerythrin* und 1,5 kDa Zyanid), PerCP-(*Peridinin chlorophyll protein*) und APC-(*Allophycocyanin*) (s. Abb. 10 Fluoreszenzspektrum). Als Negativkontrolle dienten ungefärbte Proben, zur Prüfung der Eigenfluoreszenz die jeweiligen Farbstoffisotypen.

Die so bestückten Röhrchen werden einmal kurz im Schüttler (Vortexer) gemischt und anschließend 30 Minuten bei 4° C unter Lichtausschluss inkubiert. Danach erfolgte erneut ein dreimaliges Waschen nach obigem Prinzip, um ungebundene Antikörper zu entfernen. Im Anschluss daran wurden die Proben nun im Durchflusszytometer (»FACS Calibur«, Becton Dickinson, Heidelberg) gemessen. Die Auswertung der Daten erfolgte durch die Software »CellQuest™« der Firma Becton Dickinson, Heidelberg.

2.4.3 Durchflusszytometrische Bestimmung der Endozytoseaktivität

Die endozytotische Fähigkeit von dendritischen Zellen wurde durch deren Aufnahme von fluoreszenzmarkiertem Dextran (FITC-Dextran) getestet. Bei Dextran handelt es sich um ein hochmolekulares Kohlehydratpolymer (MW 40.000 Da).

Unter sterilen Bedingungen wurden je 100.000 Zellen in ein Polystyrolröhrchen aufgenommen, zentrifugiert (10min, 20° C) und in 200µl PBS resuspendiert. Im Folgenden wurden immer zwei Ansätze parallel durchgeführt – wobei einer stets auf Eis bearbeitet/inkubiert wurde und daher als Negativkontrolle diente, da die zelluläre Aufnahmefähigkeit bei dieser Temperatur stagniert. Als Positivkontrolle wurden unreife, unbehandelte DC (Inkubation bei 37° C) eingeschlossen.

Die Dextran-Stammlösung liegt mit einer verwendeten Konzentration von 0,5 mg/ml im Sättigungsbereich der Aufnahmekapazität, so dass phagozytotische Veränderungen den Makropinozytosebereich widerspiegeln. Dazu wurden 10µl der FITC-Dextran-Lösung (entspricht 1:20 der Stocklösung) zur Zellsuspension gegeben und diese 2 Stunden im Brutschrank bzw. auf Eis inkubiert. Danach erfolgte ein dreimaliger Waschgang mit PBS (Zentrifugation 400g, 7min) zur Entfernung von nicht aufgenommenem Dextranpartikeln. Unmittelbar im Anschluss konnte die inkorporierte Fluoreszenzintensität durch Messung im Durchflusszytometer quantifiziert werden.

2.4.4 Verifizierung der lymphoproliferativen Potenz von dendritischen Zellen mittels gemischter Lymphozytenkultur und Bromdesoxyuridin-Enzyme-Linked Immunosorbent Assay

Gemischte Lymphozytenreaktion

Das Prinzip der gemischten Lymphozytenreaktion (MLR, *mixed lymphocyte reaction*) besteht in einer Kokultur von mononukleären Zellen aus dem Blut eines Donors mit PBMC eines allogenen Spenders. Sie dient als *in vitro* Modell für die Aktivierungskapazität von T-Zellen und als Test für deren Antigenerkennungsfähigkeit.

Für den Ansatz der MLR wurden Lymphozyten eines allogenen Spenders im Rahmen des Generierungsverfahrens dendritischer Zellen gewonnen (s. 2.2.2.3). Die so erhaltenen T-Zellen wurden in einer konstanten Konzentration von 2×10^5 Zellen /200 µl je Well in eine flachbödige 96-well-Mikrotiter-Platte zu den moDC eingebracht (Konzentrationsreihe moDC / Lymphozyten 1:10, 1:20, 1:40, 1:80, 1:160). Ein Gesamtvolumen von 200µl je Well wurde durch Mediumzugabe erreicht. Anschliessend inkubierte die gemischte Lymphozytenkultur für 48 Stunden im Brutschrank.

Bromdesoxyuridin-ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay)

Die Stärke der Proliferation der Lymphozyten und damit ihre Aktivierung lässt sich durch BrdU-Markierung bestimmen. BrdU ist ein Thymidinanalogon (synthetisches Nukleosid), welches von Zellen aufgenommen und während der Zellteilung in neu-synthetisierte DNA eingebaut wird. Dieser Prozess kann durch einen ELISA (immunologisches Nach-

weisverfahren, welches auf einer enzymatischen Farbreaktion basiert) dargestellt werden. Die Farbentwicklung kann photometrisch verfolgt werden. Dabei korreliert die Farbinintensität, d.h. das gemessene Ausmaß der Extinktion im Photometer mit der DNA-Neusynthese und ermöglicht so eine Aussage über die Proliferationsstärke der untersuchten Zellpopulation.

Die nachfolgenden Schritte erfolgten gemäß der Beschreibung des benutzten »Cell Proliferation ELISA, BrdU (colorimetric)« der Firma Roche, Mannheim.

Nach abgelaufener Vorinkubation der Lymphozyten mit den moDC in der MLR wurde die entsprechende BrdU – Markierungslösung von 20µl pro Well hinzupipettiert und der Versuchsansatz erneut für 6 Stunden bei 37° C inkubiert. Als Kontrollen dienten dabei zum einen reines Kulturmedium sowie als Maß für die Hintergrundfärbung unmarkierte (BrdU-freie) Zellen. Da die Zellen sich in Suspension befanden, wurden sie zunächst abzentrifugiert (300g, 10 min), dann der Überstand aus Markierungslösung und Medium dekantiert und die Platten bei 60° C eine Stunde lang getrocknet. Die Fixierung der Zellen und die Denaturierung der DNA (als Voraussetzung für die Antikörperbindung) erfolgte durch Zugabe der Fertiglösung (FixDenat, Roche, Mannheim). Nach Beifügung der Antikörperlösung (anti-BrdU-POD, monoklonaler Peroxidase-gekoppelter Mausantikörper) für 90 min und anschließender dreimaliger Waschung mit PBS-Waschpuffer bestand der vorletzte Schritt in der Zugabe der Substratlösung TMB (Tetramethylbenzidin). Das entstandene blaue Reaktionsprodukt wurde bei deutlich sichtbarer Farbinintensität nach 30 min durch Zugabe von je 25µl Schwefelsäure (H₂SO₄) gestoppt (Farbumschlag zu Gelb) und die Extinktion der Ansätze unmittelbar im ELISA-Reader gemessen (Wellenlänge 450 nm).

2.4.5 Messung der Zytokinsekretion durch Enzyme-Linked Immunosorbent Assay

Zur Bestimmung der Zytokinsekretion der moDC wurde das Zytokinprofil aus dem eingefrorenen Mediumüberstand mittels eines erneuten ELISA (OptEIA Human IL-12 (p40) bzw. -10 ELISA Kit II, Becton Dickinson, Heidelberg) verifiziert.

Dabei handelt es sich erneut um ein Sandwich-Verfahren, bei dem sich der jeweils gegen das spezifische Interleukin gerichtete, monoklonale Antikörper als feste Phase am Grunde einer 96-well-Titer-Platte befindet. Nach Zugabe von sowohl einer vorgegebenen Interleukin-Standardreihe als auch den zu untersuchenden Proben (gemäß des Kit-Protokolls) erfolgt die Primärbindung. Nach Waschung mit spezieller Pufferlösung wird dann ein mit einem Streptavidin-Meerrettich-Peroxidase-Komplex konjugierter anti-Interleukin-Antikörper hinzugefügt (ABC-Methode, s. Punkt 2.2.1.3). Als Farbstoff dient hier TMB (3',5'-Tetramethylbenzidine), dessen Intensität sich wiederum proportional zur vorhandenen Interleukinmenge ergibt. Die Zugabe der Stopp-Lösung generiert einen Farbumschlag zu Gelb; die Absorptionsmessung erfolgte anschließend bei 450nm im ELISA-Reader.

2.5 Statistik

Die Daten werden als Median plus dem Standardfehler des Mittelwertes (SEM, *standard error of mean*) angezeigt. Die statistische Signifikanz wurde durch den t-test für gepaarte Stichproben von Originalwerten festgelegt. Differenzen wurden für $p < 0,05$ als statistisch signifikant gewertet.

3 Ergebnisse

3.1 Glykodelinaufreinigung aus Aszites

3.1.1 Dotblot-Analyse

Untenstehende Abbildung (Abb. 12) zeigt eine entsprechend immunhistochemisch gefärbte Nitrozellulosemembran mit den deutlich sichtbaren glykodelinhaltigen Dots, nach chromatografischer Aufreinigung.

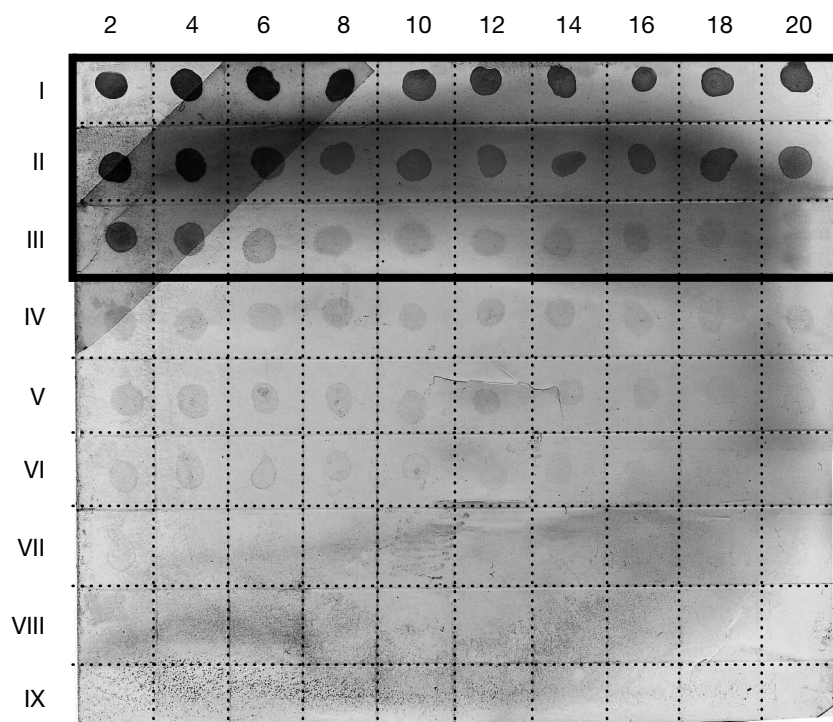


Abb. 12: Dotblot

Der Rahmen kennzeichnet die färbereisch positiven und damit glykodelinhaltigen Fraktionen auf einer immunhistochemisch vorbereiteten Nitrozellulosemembran.

3.1.2 Konzentrationsbestimmung durch Bradfordtest

Die Proteinmenge in den aufgereinigten Glykodelinchargen wurde mithilfe des Bradford-Tests quantifiziert. Abbildung 13 stellt die Proteinstandardkurve dar, anhand derer die Probenkonzentrationen ermittelt wurden.

Durch das vorangegangene Aufreinigungsverfahren wurde so Glykodelin mit einer Konzentration von 1398 $\mu\text{g/ml}$ aus ursprünglich zwei Litern gepoolter Aszitesflüssigkeit gewonnen.

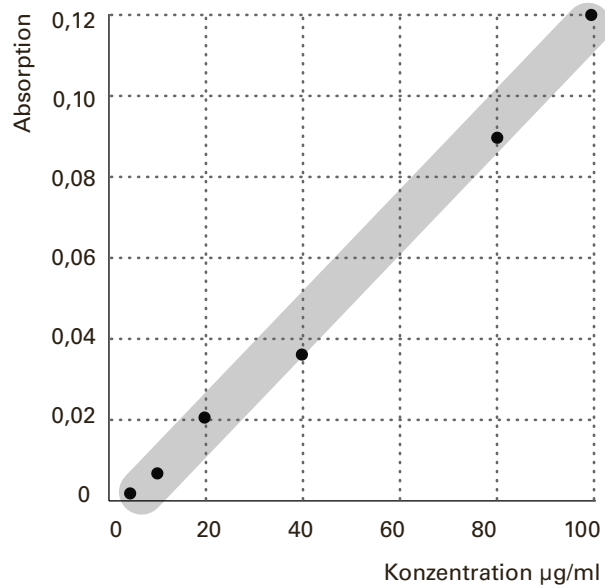


Abb. 13: Bradford-Proteinstandardkurve

Die x-Achse stellt die Proteinkonzentration in $\mu\text{g/ml}$ dar, die y-Achse zeigt die Lichtabsorption (Wellenlänge 595nm, Integrationszeit 1sec, Linearität (r^2) 99,0%).

3.1.3 Westernblotanalyse

Den Nachweis von Glykodelin im Westernblot zeigt Abbildung 14. Das Glykoprotein präsentiert sich dabei als Bande in Höhe eines Molekulargewichts von 28 kDa.

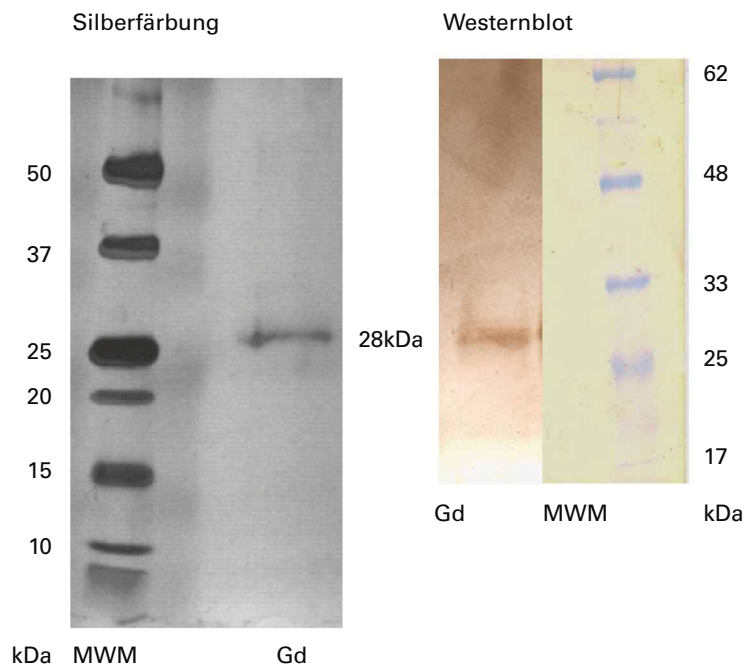


Abb. 14: Westernblotanalyse von Glykodelin aus Aszites

Rechts abgebildet ein Westernblotausschnitt, links hierzu passende Silberfärbung. Als Molekulargewichtsmarker (MGM) bezeichnete definierte Banden dienen zur Identifikation von Proteingewichten.

3.1.4 Testung auf Probenverunreinigung

Bei der Inkubation von aufgereinigtem Glykodelin mit PBMC konnte keine Produktion von $\text{TNF-}\alpha$ nachgewiesen werden. Somit wurde eine Kontamination der Glykoproteinproben mit LPS ausgeschlossen.

3.2 Begutachtung von Monozyten/monozytenabgeleiteten dendritischen Zellen

3.2.1 Phasenkontrastmikroskopische Beurteilung

Die mikroskopische Begutachtung der Zellkulturen diene vorrangig dem Ausschluss von Verunreinigungen, beispielsweise durch Pilze, sowie der Zellzählung und Überprüfung des Zellstatus in der Vitalitätsfärbung mit Trypanblau.

Außerdem ließ sich die Ausdifferenzierung von Monozyten zu dendritischen Zellen nachvollziehen. Die kultivierten Monozyten entwickelten nach sechstägiger Inkubation im Brutschrank mit den Wachstumsstimuli IL-4 und GM-CSF erkennbare Zellausläufer.

3.2.2 Durchflusszytometrische Oberflächenmarkeranalyse

Die Auswahl und spezifische Färbung der interessierenden CD-Oberflächenmarker erfolgte entsprechend des jeweiligen Versuchsaufbaus.

Färbung 1: Bestimmung der Monozytenpopulation

Grundlage der vorliegenden Experimente ist die Generierung einer mehrheitlich homogenen, unstimulierten Population von moDC. Voraussetzung hierfür ist die Gewinnung einer möglichst reinen Monozytenpopulation aus dem peripheren Blut. Hierzu wurde durchflusszytometrisch der Anteil der Monozyten durch Charakterisierung über CD14 – Antikörper bestimmt. CD14 ist ein Oberflächenglykoprotein, welches typischerweise von Monozyten und Makrophagen exprimiert wird, nicht jedoch von Lymphozyten (Bernard et al. 1984). Der durch Zelladhäsion selektionierte Monozytenteil der PBMC lag in sechs unabhängigen Experimenten bei durchschnittlich 76%, mit einer spenderabhängigen Schwankungsbreite von 65% – 89%.

Färbung 2: Identifizierung unstimulierter, monozytenabgeleiteter dendritischer Zellen

Nach sechstägiger Inkubation dieser Monozyten unter Einfluss der Differenzierungsfaktoren GM-CSF und IL-4 (Romani et al. 1994) wurde erneut die Expression des Monozytenmarkers CD14 bestimmt. Des Weiteren wurden die moDC auf die Expression der kostimulatorischen Moleküle CD83 und CD86 sowie der Rezeptoren MHC-II und DC-SIGN untersucht.

Unreife DC präsentierten sich in der FACS-Analyse entsprechend ihrer Ausreifung von Monozyten zu moDC als CD14-negativ.

Gleichzeitig konnte keine Expression reifekennzeichnender Oberflächenmoleküle wie CD83 und CD86 nachgewiesen werden.

Die beiden Rezeptoren MHC-II und DC-SIGN wiesen auf den unaktivierten moDC ein mittleres Expressionsmuster auf.

Färbung 3: Oberflächenexpressionsmuster nach Inkubation mit Glykodelin und /oder Reifestimuli

Die Aktivierung oder Reifung einer unstimulierten DC ist zum einen gekennzeichnet durch die oben erwähnte, vermehrte Expression von kostimulatorischen Molekülen. Desweiteren rekrutieren so aktivierte DC auch verstärkt antigenpräsentierende MHC II-Moleküle an ihre Oberfläche und reduzieren gleichzeitig ihre endozytotische Aktivität (Sallusto et al. 1996). Diese morphologischen Veränderungen können durch Zugabe der inflammatorischen Zytokine TNF- α und IL-1 β induziert werden (Macagno et al. 2007).

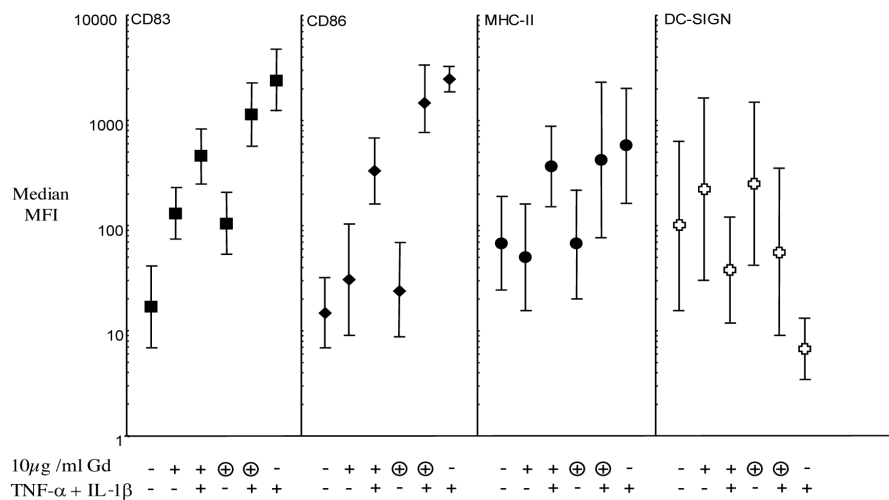
Die im Folgenden gezeigten Daten beziehen sich auf Versuche mit Glykodelin bei einer Konzentration von 10 μ g/ml. Ähnliche Resultate ergaben sich für Experimente mit 25 μ g/ml Glykodelin, wohingegen mit einer Konzentration von 5 μ g/ml die Effekte des Glykoproteins auf die untersuchten Oberflächenmarker vernachlässigbar gering waren (Daten nicht gezeigt). Nach definierter, zytokininduzierter Reifung zeigten die moDC Anstiege im Expressionsmuster für CD83, CD86 sowie MHC-II. DC-SIGN, als kohlehydratbindender Endozytoserezeptor (Figdor et al. 2002) wurde hingegen vermindert exprimiert.

Die Vorbehandlung mit 10 μ g/ml Glykodelin resultierte vergleichsweise dazu in einer geringeren Aktivierung der Kostimulatoren CD83 und CD86 und des MHC-II-Rezeptors. Die DC-SIGN-Expression war im Vergleich zur Positivkontrolle nicht reduziert.

Wurden so vorinkubierte moDC nach 24 Stunden zusätzlich mit den Reifeinduktoren stimuliert, waren diese Effekte teilweise reversibel: kostimulierende und antigenpräsentierende Oberflächenmoleküle zeigten eine verstärkte, DC-SIGN eine verminderte Präsenz, jedoch nicht in der Stärke wie die entsprechenden reinen Positivkontrollen.

Lediglich mit Glykodelin vorbehandelte moDC ohne zusätzliche Stimuli verhielten sich im Vergleich zur Negativkontrolle wie folgt: CD83, CD86 und DC-SIGN wurden teilweise vermehrt exprimiert, während MHC-II sich nahezu unverändert zeigte. Interessanterweise war die Zunahme der CD83-Expression gekoppelt an die gleichzeitige Expression von DC-SIGN (siehe Abb. 15)

Zur Kontrolle der Spezifität dieser Glykodelin-Effekte führten wir Blockierungsexperimente durch: Unter identischen Versuchsbedingungen– und Ansätzen wurden im Überschuss polyklonale Antikörper gegen verschiedene Epitope des Glykoproteins zugegeben. Hierunter zeigten sich die Glykodelin-Wirkungen teilweise reversibel.



A

B

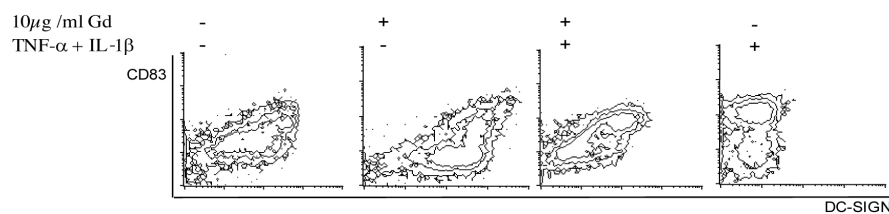


Abb. 15: Veränderte Expression dendritischer Oberflächenmarker im FACS

A zeigt die kumulativen Daten aus 9 unabhängigen Experimenten. +/- kennzeichnen die jeweiligen Reifungs-/Stimulationsbedingungen. Eingezeichnete Objekte stehen für Blockierungsversuche. Die Dots repräsentieren den MFI (mean fluorescence index) aller Experimente + SEM. B zeigt die Dichteplots für die Kombination DC-SIGN und CD83 eines repräsentativen Experiments

3.2.3 Endozytotische Aktivitätstestung im Dextran-Phagozytoseversuch

Unreife dendritische Zellen analysieren ihre Umgebung durch ständige Aufnahme von Antigenpartikeln und Präsentation dieser über MHC auf ihrer Oberfläche. Erhalten diese DC zusätzlich bestimmte Aktivierungssignale, treten sie in den Reifungsprozess ein: Sie präsentieren Peptidfragmente verstärkt über MHC-Komplexe, zusammen mit kostimulierenden Molekülen, und reduzieren gleichzeitig ihre phagozytotische Tätigkeit (Sallusto et al. 1995, Banchereau et al. 2000).

Zur Prüfung der Wirkung von Glykodelin auf die Endozytosefähigkeit von moDC wurden diese nach Vorbehandlung mit Glykodelin über einen Zeitraum von 2 Stunden mit dem fluoreszenzmarkierten Kohlehydrat FITC-Dextran bei 37°C inkubiert und anschliessend dessen Inkorporation durch Messung der Fluoreszenzintensität im Durchflusszytometer untersucht.

Zytokininduzierte, reife moDC zeigten hierbei eine deutlich reduzierte Endozytoseaktivität im Vergleich zu unreifen moDC.

Die bekannte Vorinkubation der moDC über 48 Stunden mit 10µg/ml Glykodelin ließ im Vergleich dazu jedoch keine verringerte Endozytoseaktivität erkennen, es ließ sich hingegen eine marginal verstärkte Endozytose feststellen.

Die Zugabe von polyklonalen Gd-Antikörpern in den Blockierungsversuchen änderte nichts an diesem Verhaltensmuster.

Für moDC unter Einfluss von $\text{TNF-}\alpha/\text{IL-1}\beta$ und Glykodelin konnte wiederum eine reduzierte Dextran-Aufnahme nachgewiesen werden, jedoch nicht in dem Maße, wie mit Zytokinstimulation allein. Durch Antikörperblockade konnte wiederum kaum eine Veränderung dieses Effekts erzielt werden.

Die Negativkontrollen, entsprechend identischen Versuchsansätzen inkubiert bei 0°C, zeigten entsprechend zu keiner Zeit eine signifikante Dextran-Aufnahme (Daten nicht gezeigt).

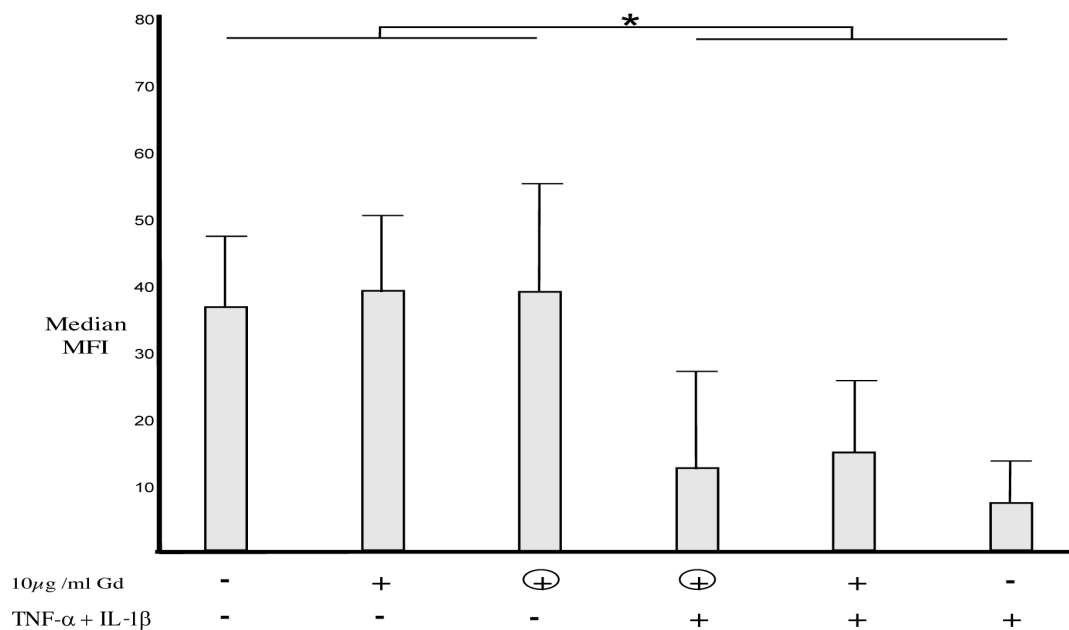


Abb. 16: Endozytotische Aktivität dendritischer Zellen

Die Abbildung zeigt Daten aus 9 Experimenten. +/- kennzeichnen die jeweiligen Reifungs-/Stimulationsbedingungen. Eingekreiste Objekte stehen für Blockierungsversuche. Die Ergebnisse werden als MFI (mean fluorescence index) angezeigt, Fehlersäulen markieren den SEM. Klammern mit Stern kennzeichnen statistische Signifikanz

3.2.4 Lymphoproliferative Aktivität

Zur Testung der funktionellen Eigenschaften von mit Glykodelin behandelten moDC wurde ihre T-Zell-stimulierende Potenz mithilfe eines BrdU-Proliferationsassays in einer allogenen Kokultur aus PBMC und DC untersucht. Hierzu wurde eine Konzentrationsreihe mit konstanter Lymphozyten- und abfallender DC-Zahl in definierten Verhältnissen (1:10, 1:20, 1:40, 1:80, 1:160) erstellt. Nach 48 Stunden Kokultur dieser Zellen wurde die BrdU-Lösung hinzugefügt und deren Inkorporation in proliferierende Lymphozyten nach 6 Stunden Inkubation photometrisch gemessen. Die Messungen erstreckten sich auf unreife moDC, reifestimulierte moDC, moDC mit 10µg/ml Glykodelin vorinkubiert, mit 10µg/ml Glykodelin vorinkubierte und zusätzlich reifungsinduzierte moDC, sowie Blockierungsversuchen unter Zugabe von Glykodelinantikörpern.

Eine Vorbehandlung mit 10µg/ml Glykodelin zeigte eine deutlich reduzierte lymphoproliferative Kapazität der moDC im Gegensatz zu ihren voll ausgereiften Pendanten. Die Aktivität, Lymphozyten zu stimulieren sank um 33%.

Im selben Setting unter Blockierungsbedingungen sank die Stimulationspotenz der Gd-behandelten moDC im Vergleich zu den vollkommen ausgereiften moDC um 20%.

Im Vergleich unstimulierter zu Gd-präinkubierter moDC konnte für Letztere ein Anstieg von 25% für BrdU⁺-Lymphozyten ausgemacht werden.

Unter Zugabe von Glykodelinantikörpern im Überschuss war dieser Effekt weniger ausgeprägt und die lymphoproliferative Aktivität stieg lediglich um 7% im Vergleich zu den unbehandelten, unreifen moDC.

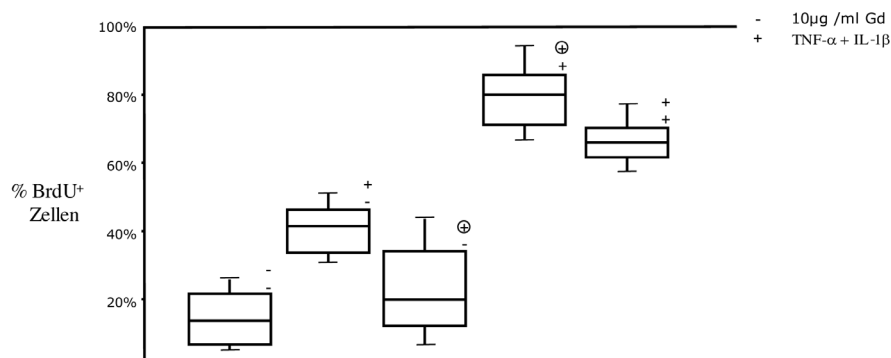


Abb. 17: Lymphoproliferative Aktivität dendritischer Zellen im BrdU-ELISA

Die Abbildung zeigt kumulative Daten aus 9 Experimenten. +/- kennzeichnen die jeweiligen Reifungs-/ Stimulationsbedingungen. Eingekreiste Objekte stehen für Blockierungsversuche. Die Daten wurden normalisiert gegen stimulierte DC. Fehlersäulen markieren den SEM.

3.2.5 Zytokinsekretionsprofil

Dendritische Zellen sind in der Lage, im aktivierten Zustand eine Reihe von Zytokinen zu produzieren. Über das Sekretionsmuster können sie Einfluss auf die Art der Immunantwort nehmen. Die Zytokine IL-10 und IL-12 sind Protagonisten im Rahmen dieses

immunstimulatorischen Geschehens: IL-12 besitzt eine zentrale Funktion in der Anstoßung und Fortdauer einer Th1-Antwort und besteht aus den beiden Untereinheiten IL-12p35 und IL-12p40, die in Kombination die bioaktive Variante IL-12p70 formieren. Verschiedene Stimuli fördern die Sekretion von IL-12 durch DC, wie beispielsweise die proinflammatorischen Zytokine TNF- α , IL-1 β , IL-6, PGE2 (Prostaglandin E2) oder Purinderivate (Kapsenberg 2003).

IL-10 als eines der wichtigsten antientzündlichen Zytokine ist hingegen bedeutend für die Entwicklung von immunologischer Toleranz (Grütz 2005).

Zur Untersuchung des Zytokinprofils unterschiedlich behandelter moDC wurde die Sekretion dieser beiden Zytokine mithilfe eines ELISA analysiert.

TNF- α - und IL-1 β -stimulierte DC wiesen eine mediane IL-12p40-Sekretion von 3403pg/ml (Spanne von 2956 – 4302pg/ml) und eine mediane IL-10-Sekretion von 103pg/ml (Spanne von 85-142pg/ml) auf.

Dieses Zytokinmuster verschob sich zugunsten eines IL-10-dominanten Milieus, sofern vor der Reifeinduktion 10 μ g/ml Glykodelin hinzugefügt wurde. In diesem Fall wurde eine Median von 1956pg/ml für IL-12p40 (Spanne 1689 – 2235pg/ml) ermittelt, die mediane IL-10-Konzentration betrug dagegen 357pg/ml (Spanne 289 – 453 pg/ml).

Die alleinige Glykodelininkubation der moDC ohne darauffolgende Reifestimulation resultierte in einer wesentlich geringeren IL-10-Produktion (Median 98pg/ml bei einer Spanne von 82 – 110pg/ml).

Auch gänzlich unstimulierte moDC wiesen nur geringe IL-10-Werte im Median von 52pg/ml auf (Spanne 26 – 63pg/ml).

In beiden Fällen war unter diesen Versuchsbedingungen lediglich sehr niedrige Konzentration von IL-12p40 nachweisbar.

Im Vergleich dazu veränderten Blockierungsexperimente mit anti-Gd-Antikörpern das sezernierte Zytokinmuster Gd-inkubierter moDC mit 118pg/ml (Spanne 99 – 154pg/ml) kaum.

Bei Gd-vorbehandelten moDC mit konsekutiver Reifeinduktion verschob sich in den Blockierungsansätzen des Zytokinprofil hingegen wieder zugunsten von IL-12 mit 3758pg/ml (Spanne 2984 – 4689pg/ml) und 186pg/ml für IL-10 (Spanne 125 – 251pg/ml) im Median.

Eine Erhöhung der Glykodelinkkonzentration auf 25µg/ml veränderte diese Sekretionsmuster nicht, eine Erniedrigung der Konzentration auf 5µg/ml wies keine statistisch signifikanten Effekte auf.

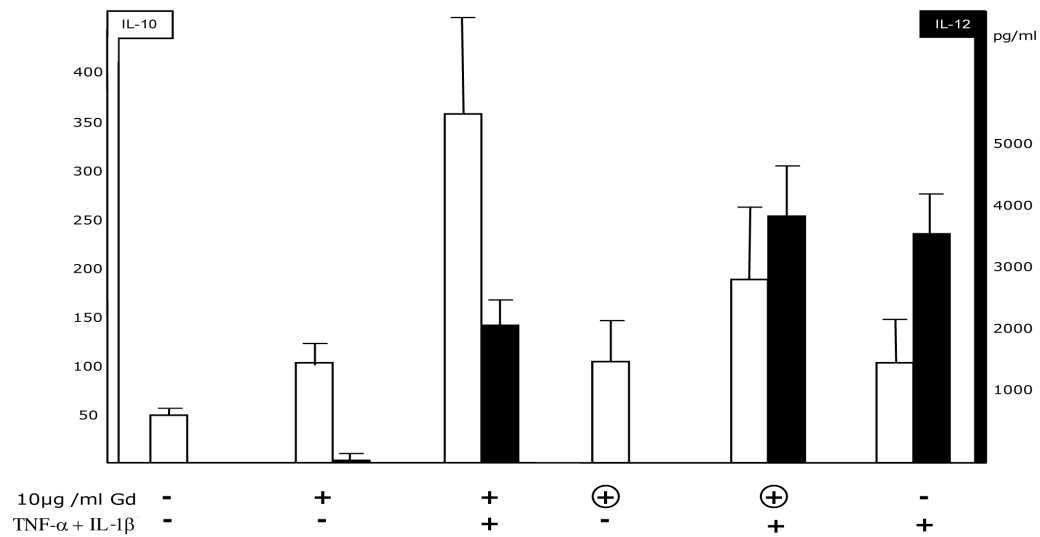


Abb. 18: Zytokinsekretionsprofil dendritischer Zellen

Die Abbildung zeigt Daten aus 6 unabhängigen Experimenten +/- kennzeichnen die jeweiligen Reifungs-/Stimulationsbedingungen. Eingekreiste Objekte stehen für Blockierungsversuche, Fehlersäulen markieren den SEM.

4 Diskussion

4.1 Zusammenfassung der Ergebnisse

Als Grundlage für die vorliegenden Experimente dienten die Beobachtungen, dass Glykodelin, als bekanntes Glykoprotein mit immunsuppressiven Eigenschaften, auch in Zusammenhang mit gynäkologischen Malignomen auftritt, unter anderem in der Aszitesflüssigkeit von Ovarialkarzinompatientinnen (Jeschke et al. 2009; Bischof et al. 2005). Den bisherigen Untersuchungen zufolge erstrecken sich die immunhemmenden Eigenschaften von Glykodelin vor allem auf T-Lymphozyten und natürliche Killerzellen (Rachmilewitz et al. 1999; Okamoto et al. 1991).

Die Wirkung auf dendritische Zellen, als zentrale Regulatoren des Immungeschehens, wurde bislang noch nicht betrachtet.

In dieser Arbeit wurde daher geprüft, ob Glykodelin, isoliert aus Ovarialkarzinomaszites, den Aktivierungsstatus und die immunstimulierende Potenz von dendritischen Zellen beeinflussen kann. Hierzu wurden DC aus Monozyten gesunder Spender generiert und Glykodelin aus Aszites in mehreren Aufreinigungsschritten isoliert. In einem *in vitro* Modell wurden diese sogenannten moDC zunächst mit Glykodelin inkubiert.

Im Durchflusszytometer wurden die DC anschließend immunologisch anhand definierter Oberflächenmarker charakterisiert. Dabei zeigte sich ein im Vergleich zu vollstimulierten moDC-Kontrollen weitgehend unreifer Phänotyp mit verminderter Expression der kostimulierenden Moleküle CD83 und CD86 und des Antigen-Präsentators MHC-II, nicht jedoch des kohlehydratbindenden Rezeptors DC-SIGN. Zum Teil waren diese Effekte durch Kostimulation mit TNF- α und IL-1 β bzw. Zugabe glykodelinblockierender Antikörper reversibel.

Eine Testung der Endozytosefähigkeit ergab entsprechend der unveränderten DC-SIGN-Ausprägung im Dextran-Phagozytoseversuch keine reduzierte Aufnahmetätigkeit der Glykodelin-vorinkubierten moDC.

Die Kapazität, Lymphozyten in der gemischt-allogenen Kokultur zu stimulieren sank im Vergleich zu vollausgereiften DC deutlich im BrdU-ELISA, was wiederum korreliert mit der beobachteten phänotypischen Unreife.

Unterstützend ergab die Analyse der Zytokinsekretion ein IL-10-prominentes, supprimierendes Profil bei gleichzeitiger Inkubation von DC mit Glykodelin und Reifeinduktoren, wohingegen Glykodelin alleine lediglich eine schwache IL-10-Produktion vorweisen konnte.

4.2 Beurteilung der Analysekomponenten

4.2.1 Gewinnung von Aszitesglykodelin

Die Isolation von reinem Glykodelin aus der Aszitesflüssigkeit stellt eine Grundvoraussetzung für die vorliegenden Experimente dar. Erstmals ausführlich beschrieben ist die Aufreinigung von Glykodelin durch Riittinen aus Amnionflüssigkeit des 3. Trimenons (Riittinen et al. 1989).

Jedoch war die Detektion und Quantifizierung dieses Glykoproteins in Geweben und Flüssigkeiten in der Vergangenheit vor allem beschränkt durch die mangelnde Verfügbarkeit kommerziell erhältlicher Antikörper. Es wurden daher verschiedene Techniken angewandt, um Glykodelin messbar zu machen, wie durch Radioimmunoassays (Julkuunen et al. 1984; Bolton et al. 1986), ELISA-Verfahren und laboreigener Generierung von Antikörpern, wie kürzlich beschrieben (Poddar et al. 1998; Karri et al. 2000; Jeschke et al. 2005). Neueste Studien arbeiten mit rekombinant erzeugtem Glykodelin (rGd) (Tee et al. 2008; Karande et al. 2005). Probleme ergeben sich hierbei jedoch noch in der Herstellung des Proteins aufgrund seiner komplexen Glykosilierungsstrukturen, die jedoch mit großer Wahrscheinlichkeit seine biologische Wertigkeit ausmachen (van der Nieuwenhof et al. 2000). Daher wurde in dieser Arbeit nach dem in unserer Arbeitsgruppe etablierten und publizierten chromatografischen Aufreinigungsmodus für Glykodelin verfahren (Jeschke et al. 2005).

Das Vorkommen von Glykodelin im Zusammenhang mit dem Ovar ist im Gegensatz zum bekannten GdA noch weniger erforscht. Der erste Nachweis von ovariellm Glykodelin gelang Kamarainen et. al 1996 (Kamarainen et al. 1996) immunhistochemisch in serösen Ovarialtumoren unter Verwendung polyklonaler (Hase) und monoklonaler (Maus) anti-Gd-Antikörper. Während diese Gruppe keine Glykodelinexpression in muzinösen Tumorformen nachweisen konnten, belegen Horowitz et. al mithilfe eines polyklonalen Antikörpers (Huhn) gegen eine synthetische Glykodelinpeptidsequenz auch ein Vorkommen in diesem Subtyp (Horowitz et al. 2001). Darüber hinaus konnten tumorassoziiert erhöhte Glykodelinlevel auch in Körperflüssigkeiten wie Zysten, Patientenserum und Aszites nachgewiesen werden (Bischof et al. 2005; Jeschke et al. 2005, 2009). Neueste Studien erbrachten unter Verwendung polyklonaler Antikörper vom Hasen (Bioscience,

Berlin) wiederum im Gegensatz zu früheren Ergebnissen, den Glykodelinnachweis in allen Formen epithelialer Ovarialkarzinome (Jeschke et al. 2009).

Diese zum Teil kontroversen Beobachtungen legen den Schluss nahe, dass zum einen der Karzinomsubtypus Bedingung für Vorkommen und Quantität des Glykoproteins sein könnte. In unseren Experimenten wurde Aszitesflüssigkeit von 3 Patientinnen mit serösem Tumortyp und 2 Patientinnen mit muzinösen Tumoren gepoolt verwandt, ohne weitere Unterscheidung zwischen diesen beiden Tumorentitäten, basierend auf den obig erwähnten Ergebnissen in unserer Arbeitsgruppe (Jeschke et al. 2009)

Zum anderen könnte die Wahl des Antikörpers Einfluss auf die spezifische Nachweisbarkeit von Glykodelin haben. In den vorliegenden Experimenten wurde ein kommerziell erhältlicher, unkonjugierter polyklonaler Antikörper (C15 sc12291) der Firma *Santa Cruz Biotechnology* verwandt. Dieser anti-Gd-IgG-Antikörper wurde in der Ziege generiert und richtet sich gegen 15 spezifische Epitope in der Nähe des Carboxyl-Terminus von menschlichem Glykodelin.

Die Bestätigung, dass es sich unter Verwendung dieser Isolationsmethoden um reines Glykodelin handelt, erbrachte die bei einem Molekulargewicht von etwa 26 – 28 kDa in Erscheinung getretene solitäre Bande in der SDS-PAGE.

Die geringfügige Schwankung bezogen auf das bekannte Molekulargewicht des Glykoproteins (Riittinen et al. 1991) erklärt sich möglicherweise durch eine veränderte, reduzierte Glykosylierung des Proteins. Hierzu passen auch die Beobachtungen aus unserem Chromatogramm, wo sich neben dem Hauptpeak ein geringfügiger sekundärer Peak abzeichnete. Es handelt sich dabei am ehesten um dasselbe Protein, mit veränderter Kohlenhydratstruktur.

Allerdings kann ein unterschiedliches molekulares Proteingewicht auch auf co-transkriptionelle RNA-Prozessierungen wie Spleißen zurückzuführen sein. Neben dem gängigen Glykodelinmolekül wurde bereits das Auftreten von alternativen mRNA-Splicevarianten in Brusttumoren und im männlichen Genitaltrakt beschrieben (Kamarainen et al. 1999; Koistinen et al. 1997).

In diesen Fällen ist zu bedenken, dass die Glykosylierungsstruktur bekanntermaßen mit verschiedenen, sehr unterschiedlichen Funktionen einhergeht. So erhöht sie von manchen Proteinen die Stabilität und schützt diese vor einem proteolytischen Abbau. Viele Proteine falten sich auch nicht korrekt, wenn sie nicht zuvor glykosyliert wurden – die entsprechende Glykosylierung dient also auch der richtigen Proteinkonformation und Veränderungen resultieren möglicherweise in einer geänderten Affinität für Bindungspartner wie Rezeptoren.

4.2.2 Auswahl der Glykodelinkonzentrationen

Bei der Entscheidung für die eingesetzten Mengen an Gd-Protein müssen verschiedene Aspekte Berücksichtigung finden: Durch Verwendung einer Konzentrationsspanne kann eine mögliche Dosisabhängigkeit der Wirkungseffekte zur Darstellung kommen. Gleichzeitig soll die Festlegung von Grenzen vermeiden, dass differenzierte Effekte unaufgedeckt bleiben, indem eine Unter – bzw. Überdosierung stattfindet.

Ein Zusammenhang zwischen Glykodelinkonzentration – und Wirkung beschrieben erstmals Pockley et al. (Pockley et al. 1988). Die einzelnen Studiengruppen zu Glykodelin A experimentieren jedoch mit teilweise sehr unterschiedlichen Dosen. Kürzliche Versuche mit Aszitesglykodelin in unserer Arbeitsgruppe zeigten, dass dieses konzentrationsabhängig die Proliferation von aktivierten PBMC in BrdU-Experimenten hemmt (Jeschke et al. 2009). Der entscheidende Sprung im BrdU-Uptake fand dabei im Bereich zwischen 10 µg/ml und 50 µg/ml statt, höhere Konzentrationen konnten hingegen keine darüber hinaus gesteigerten Effekte erzielen.

Für unsere Versuchszwecke fiel deshalb die Auswahl auf Konzentrationen von 5, 10 und 25 µg/ml für Glykodelin aus Aszitesflüssigkeit.

4.2.3 Generierung von monozytenabgeleiteten dendritischen Zellen

Die Gewinnung dendritischer Zellen erfolgte im Rahmen dieser Arbeit aus CD14⁺ Blutmonozyten unter Zuhilfenahme von IL-4 und GM-CSF (Romani et al. 1994; Bender et al. 1996; Thurner et al. 1999). Auf diese Weise ausdifferenzierte moDC zeigen ein charakteristisches Oberflächenmolekülprofil: Sie differenzieren zu CD14⁺ negativen Zellen, d.h. sie verlieren den für sie typischen, hochaffinen LPS-Rezeptor und weisen gleichzeitig die typische Morphologie großer granulärer Zellen mit langen Zytoplasmaausläufern auf (Steinman, Cohn 1973). Die in dieser Arbeit unter Standardbedingungen generierten DC entsprachen den beschriebenen Anforderungen.

Für IL-4 als Differenzierungsfaktor ist allerdings zu bedenken, dass es sich eigentlich um ein klassisches Th2-Interleukin handelt, unter dessen Einfluss naive T-Zellen zu Th2-Zellen differenzieren. D'Andrea et al. zeigten, dass der Zusatz von IL-4 zu PBMC in den ersten 20 Stunden Inkubation deren Zytokinproduktion (unter anderem auch IL-12) als Antwort auf LPS-Stimulation deutlich dämpfte, im Zeitraum darüber hinaus allerdings zu einer verstärkten IL-12-Produktion führte (D'Andrea et al. 1995). Diese Th1-unterstützende Aktivität wurde auch als reziproker IL-4-Effekt auf Th2-Zellen, wiederum über Förderung derer IL-12-Sekretion, nachgewiesen (Kalinski et al. 2000). In unseren Experimenten könnte der Einsatz von IL-4 zu einer erhöhten Produktion von IL-12 geführt haben, jedoch waren die Grundbedingungen für die generierten DC immer identisch, so dass speziell im Hinblick auf die Zytokinmessversuche die Grundbereitschaft zur IL-12 Produktion in den DC möglicherweise erhöht war. Die tatsächlich gemessenen Wertunterschiede in den verschiedenen Settings sind dadurch allerdings nicht begründbar.

Das *in vitro* Modell impliziert, dass derartig *ex vivo* generierte DC ein ähnliches physiologisches Verhalten zeigen wie DC humanen Ursprungs. Allerdings konnte bisher nicht eindeutig nachgewiesen werden, ob ein entsprechender Differenzierungsweg von Monozyten zu dendritischen Zellen auch *in vivo* existiert. Einige Autoren gehen davon aus, dass sich nur aus einer bestimmten Gruppe von Monozyten DC entwickeln. So konnten Crawford et al. zeigen, dass CD2⁺ Monozyten sich nach Inkubation mit GM-CSF und IL-4 als potentere Stimulatoren der T-Zell-Proliferation darstellten als moDC (Crawford et al. 1999). Randolph et al. wiederum identifizierte CD16⁺ Monozyten als Subpopulation, die sich durch transendotheliale Migration zu DC mit migratorischem Potential entwickeln (Randolph et al. 1998; Randolph et al. 2002).

4.2.4 Reifeinduktion monozytenabgeleiteter dendritischer Zellen

Zur Ausübung ihrer vollen Funktion als antigenpräsentierende Zelle benötigen die generierten DC einen sogenannten Reifestimulus (Steinman et al. 1999). Unter physiologischen Bedingungen geschieht dies ständig durch Aufnahme von Antigenen bzw. entzündliche Gewebssignale, denen die DC ausgesetzt sind. *In vitro* lässt sich dieser Prozess durch verschiedene Reifestimulatoren imitieren. Als potentesten »Cocktail« wiesen Jonuleit et al. eine Kombination aus IL-1 β , IL-6, TNF- α und Prostaglandin E₂(PGE₂) aus (Jonuleit et al. 1997). Für unsere Experimente war wichtig, möglichst optimal reifestimulierte DC zu erhalten, um eine Vergleichbarkeit zur Reifesituation glykodelinstimulierter DC herzustellen. Wir haben dafür die Kombination aus TNF- α und IL-1 β als Stimuli verwandt. IL-1 ist eines der erstbeschriebenen Zytokine und für seine proinflammatorische Wirkung bekannt. Hauptsächlich wird es von Makrophagen, Monozyten und DC selbst sezerniert. Eine DC-reifeestimulierende Wirkung wiesen Yamada et al. 1999 nach, indem sie die Wirkung verschiedener Reifestimuli auf eine Langerhanszell (LC)-ähnliche Zelllinie (SX52) untersuchten (Yamada et al. 1999). Weitere Experimente wiesen IL-1 β als erstes Zytokin aus, welches T-Zell-unabhängig die CD40-Ligand-vermittelte DC-Reifung fördert und verstärkt (Luft et al. 2002).

Der etwaige Vorteil in der Verwendung von TNF- α mit IL-1 β liegt in ihrer effektiven Reifungsstimulation der DC mit Produktion von IL-12 und damit wirkungsvoller Th1-Immuninduktion. In diesem Zusammenhang wäre PGE₂ kritisch zu sehen, da sich Prostaglandine zwar als besonders wirkungsvolle Reifestimulantien für DC auszeichnen. Speziell PGE₂ stellte sich dabei in vergleichenden Untersuchungen als potentester Reifungsinduktor heraus und verstärkt zusammen mit TNF- α und IL-1 β deren Reifungseffektivität bedeutend (Steinbrink et al. 2000; Kalinski et al. 1998). Allerdings liegen Daten vor, die zeigen, dass eben dieses PGE₂ eine Polarisation der naiven T-Zelle zugunsten einer Th2-Immunantwort begünstigt, indem es die Sekretion von bioaktiven IL-12p70 unterdrückt (Kalinski et al. 1998; Kalinski et al. 2001). Aus diesem Grund haben wir auf den Einsatz von PGE₂ verzichtet.

4.3 Diskussion eigener Ergebnisse vor dem Hintergrund aktueller Literatur

4.3.1 Oberflächenmarkerexpression in der Fluorescence activated cell sorting-Analyse

Als Zeichen der dendritischen Zellreife wurde ein Oberflächenmuster mit CD83⁺, CD86⁺ und MHC-II^{high} und DC-SIGN^{low} interpretiert. Diese Ergebnisse stehen in Übereinstimmung mit den bekannten DC-Reifekriterien und wurden von den mit TNF- α und IL-1 β -stimulierten DC erfüllt (Steinman et al. 1997; Banchereau et al. 1998).

CD83 stellt ein membrangebundenes Glykoprotein aus der IgG-Superfamilie dar und gilt mittlerweile als typischer Marker für voll ausgereifte dendritische Zellen. Zhou et al. beschrieben dieses Oberflächenmolekül erstmals auf interdigitierenden Retikulumzellen, Langherhanszellen und aktivierten Lymphozyten, kurz darauf konnte CD83 als charakteristischer DC-Reifemarker identifiziert werden (Zhou et al. 1992; Zhou, Tedder 1995). Daneben spielt CD83 möglicherweise eine wichtige Rolle im Rahmen der Induktion von T-Zell-Antworten, wie Daten um die Arbeitsgruppe von Scholler et al. nahelegen (Scholler et al. 2001; 2002). Auch Hirano et al. konnten zeigen, dass die Bindung von CD83 antigenspezifische CTL-Immunantworten verstärkt (Hirano et al. 2006). Unterstützt wird diese Hypothese durch Experimente von Yang et al., in denen durch mit CD83 transfiizierte Melanomzellen eine Antitumorimmunität erzielt werden konnte (Yang et al. 2004). Die genauen Mechanismen der Signalgebung sind allerdings noch weitgehend unklar.

DC präsentieren internalisierte exogene Antigene, welche zellintern via enzymatische Prozessierung verarbeitet wurden, auf der Zelloberfläche über MHC-II-Moleküle. Während in unreifen DC diese nur eine kurze Lebensdauer besitzen, führt eine Reifeinduktion zur massiven Verstärkung der MHC-II-Synthese und Translokation auf die Zelloberfläche, wo sie für längere Zeit stabil für die Erkennung durch T-Helferzellen zur Verfügung stehen (Banchereau et al. 2000).

CD86 (B 7.2) gehört zusammen mit CD80 (B 7.1) zur B7-Familie der kostimulierenden Moleküle. Beide Liganden binden CD28 und/oder CTL4 (*Choline Transporter Like Protein*) auf T-Zellen und liefern über Interaktion mit Ersterem neben der TCR-Antigenbindung das zweite Signal für die effektive T-Zellstimulierung (Sharpe, Freeman 2002). Andernfalls verfällt diese in einen anergen Zustand (Schwartz 2003). Während CD86 konstitutiv in geringer Zahl exprimiert, aber rapide hochreguliert werden kann, wird CD80 erst zu einem späteren Zeitpunkt in der Aktivierungsphase induziert (Freeman et al. 1993; Hathcock et al. 1994). Obwohl beide überlappende Spezifität für CD28 besitzen, suggeriert die frühere Expression eine größere Bedeutung für CD86, was in Knockout-Mausversuchen bestätigt wurde (McAdam et al. 1998). Aus diesen Gründen entschieden wir uns für diesen Marker.

Vergleicht man nun oben erwähnte, voll ausgereifte DC mit denjenigen, welche davor mit 10 μ g/ml Glykodelin präinkubiert wurden, so lässt sich als Ausdruck eines deutlich verringerten Reifestatus die reduzierte Expression von CD83, CD86 und MHC-II feststel-

len. Diese Unreife ist übersetzbar in eine verminderte immunstimulatorische Potenz der DC, vermittelt durch Glykodelin. Dazu passen auch die Beobachtungen einer teilweisen Reversibilität des Gd-Effektes durch nachträgliche Stimulation mit den Reifungsinduktoren $\text{TNF-}\alpha/\text{IL-1}\beta$ bzw. Aufhebung der Glykodelinwirkung durch Antikörper gegen das Glykoprotein.

Anders verhielt es sich mit DC-SIGN, einem weiteren Oberflächenmarker von DC, der von uns genauer untersucht wurde. DC-SIGN oder CD209 ist ein transmembranes, sogenanntes Typ-II C-Typ-Lektin. Unterschieden wird in zwei Typen anhand der Orientierung ihres N-terminalen Aminosäureendes nach extra- bzw. intrazytoplasmatisch (Figdor et al. 2002). DC-SIGN wird von Makrophagen und DC exprimiert und wurde ursprünglich aufgrund der Entdeckung seiner hochaffinen Bindungsfähigkeit zu diesem Adhäsionsmolekül als ICAM-3-Rezeptor bezeichnet (Geijtenbeek et al. 2000). Da ICAM-3 in großer Anzahl von ruhenden T-Lymphozyten exprimiert wird, sorgt DC-SIGN für die Stabilisierung der Kontaktzone zwischen DC und T-Zelle während des Prozesses der Antigenerkennung. Über DC-SIGN-ICAM-2-Interaktion ist das Molekül außerdem wesentlich beteiligt an der chemokininduzierten Transmigration dendritischer Zellen durch das vaskuläre Endothel (Geijtenbeek et al. 2000). Neben diesen Bindungseigenschaften fungiert DC-SIGN auch als Ligand für HIV-1 (*human immunodeficiency virus*), indem es dessen Oberflächenglykoprotein (gp) 120 bindet und über den Transport in T-Zell-reiche Lymphregionen die Virustransmission verstärkt (Curtis et al. 1992; Geijtenbeek et al. 2000).

In Bezug auf dendritische Zellen dienen die verschiedenen membrangebundenen Lektine neben ihren adhäsiven Aufgaben in unreifen DC vor allem als Endozytoserezeptoren, welche nach Bindung löslicher Antigene von der Zelloberfläche internalisiert werden. Diese DC-SIGN – Ligandenkomplexe werden gezielt zu den späten Endosomen/Lysosomen transportiert. Anschließend erfolgt die Präsentation der Peptidfragmente auf MHC-II (Engering et al. 2002). Der genauere Verarbeitungsweg, speziell auch im Hinblick auf Rezeptorre cyclingmechanismen, wie beschrieben für den Multilektinrezeptor DEC205, ist jedoch noch unklar. Klar zu beobachten ist hingegen, dass reife moDC ihre Produktion von DC-SIGN deutlich reduzieren (Kato et al. 2000). Diese verminderte endozytotische Fähigkeit ist ein Reifekriterium und wurde von den in unseren Experimenten stimulierten DC erfüllt. Während jedoch mit Glykodelin vorbehandelte DC weniger CD83 und CD86, im Sinne einer phänotypischen Unreife exprimierten, verhielt sich DC-SIGN, verglichen mit den Positivkontrollen, nahezu unverändert.

Interessanterweise konnten wir eine distinkte DC-SIGN⁺/CD83⁺-Population unter Glykodelininkubation ausmachen, die möglicherweise für einen sogenannten semimaturen DC-Typus steht. Wie in der Einleitung bereits erwähnt, sind DC neben der Induktion potenter Immunantworten auch mitverantwortlich für immunologische Toleranz. Es gibt Berichte über »halbreife« DC, eine Subgruppe bzw. Entwicklungsstufe die sich durch hohe Expression von MHC-II und Kostimulatoren als reif auszeichnen, gleichzeitig aber keine oder nur eine geringe Produktion der proinflammatorischen Zytokine wie $\text{TNF-}\alpha$,

IL-6 und im speziellen IL-12 aufweisen und zur antigenspezifischen Aktivierung von IL-10-sezernierenden CD4⁺ Lymphozyten führt (Lutz, Schnitzler 2002). Die Sekretion von IL-10 durch diese DC selbst hingegen wurde beschrieben, jedoch nicht als zwingende Voraussetzung.

Möglicherweise nehmen Lektine also nicht nur eine Endozytose- sondern auch eine Signalfunktion ein. Für eine Rolle von Lektinrezeptoren im Toleranzgeschehen, passend zu unseren Ergebnissen, sprechen auch Untersuchungen von van Vliet et al. (van Vliet et al. 2006). Diese stellten fest, dass die Expression bestimmter C-Typ-Lektine *in vitro* auf den DC unterschiedlich reguliert wird. Beispielsweise führt die Generierung tolerogener DC mittels Dexamethason zu einer verstärkten Expression des Lektinrezeptors MGL (*Macrophage galactose-Type lectin*). Auch in unseren Versuchen zeigte sich im Direktvergleich mit unbehandelten moDC eine geringfügig verstärkte DC-SIGN-Oberflächenpräsenz.

Zurückkommend auf die kohlehydratspezifische Antigenbindungsfähigkeit von Lektinrezeptoren, deuten verschieden Studien darauf hin, dass DC-SIGN typischerweise mannosereiche oder fucosilierte Glykanstrukturen erkennt und bindet (Appelmelk et al. 2003). Darunter finden sich etwa das hochgradig mannosehaltige HIV-1-Glykoprotein 120 (Geijtenbeek et al. 2000), fucosylierte Blutgruppenantigene vom Typ Lewis ($Le^{x,y,a,b}$) aber auch selektive Pathogene, die diese Glykane aufweisen, beispielsweise *Helicobacter pylori*, *Mycobacterium tuberculosis* oder *Schistosoma mansoni* (Appelmelk et al. 2003). Van Liempt et al. warfen einen genaueren Blick auf diese Zuckerstrukturen und analysierten eine Vielzahl von potentiellen DC-SIGN-Liganden. Die höchste Bindungsaffinität machten sie dabei für fucosilierte bi-lac-di-NAc-N-Glykane aus (van Liempt et al. 2006). Vergleicht man diese Glykane mit dem einleitend beschriebenen bekannten Glykosilierungsmuster von Glykodelin A, stellt man fest, dass das Glykoprotein mehrere Gemeinsamkeiten aufzuweisen hat. So finden sich neben Mannose auch komplexe Glykanstrukturen, darunter Le^x und sialylierte lacdiNAcs, die für eine Bindung von DC-SIGN und Gd sprechen (Dell et al. 1995).

Des Weiteren besitzt Glykodelin mit seinen fucosylierten lac-di-NAc-N-Glykanen als einziges Glykoprotein in Säugetieren den stärksten DC-SIGN Bindungspartner, der ansonsten nur in Helminthen wie *Schistosoma mansoni* (*S. mansoni*) vorzufinden und vielfach Gegenstand der Forschung ist (van Die et al. 2003). Untersuchungen hierzu mit SEA (*soluble egg antigen*, einer Mischung aus Glykoproteinen- und lipiden, die von *S. mansoni*-Eiern sezerniert werden) deuten auf eine immunmodulierende Rolle dieser Glykane in Bezug auf DC. So konnten van Liempt et al. zeigen, dass SEA dosisabhängig die TLR-induzierte Ausreifung von DC unterdrückt, sichtbar anhand einer verminderten Expression der kostimulierenden Moleküle CD80, CD83 und CD86 (van Liempt et al. 2007). Diese Beobachtung weisen eine frappierende Ähnlichkeit zu den Effekten von Aszites-Glykodelin auf DC in den hier gezeigten Experimenten auf.

Speziell im Zusammenhang mit Tumoren gelang Nonaka und Kollegen kürzlich der Nachweis einer Wechselwirkung zwischen Lewis-Antigen-exprimierenden Kolonkarzinomzellen und DC-SIGN auf moDC (Nonaka et al. 2008) Die untersuchte Interaktion

fürte zu einer beobachtbaren Ausreifungshemmung der DC durch LPS-Stimulation und gleichzeitig gesteigerter Sekretion der Zytokine IL-6 und IL-10. Diese Effekte ließen sich durch die Verwendung von anti-DC-SIGN-Antikörpern signifikant unterdrücken. Auch hierbei handelt es sich um eindeutige Parallelen zu unseren Ergebnissen. Zusammenfassend können wir sagen, dass die hier aufgezählten Faktoren auf eine spezifische Interaktion von Glykodelin mit DC-SIGN deuten. Dabei spielt die spezielle Glykosilierungsstruktur womöglich eine entscheidende Rolle. Für ein differenzierteres Verständnis dieses Zusammenspiels sind jedoch noch weiterführende Experimente nötig, etwa um detaillierte Schritte der intrazellulären Signaltransduktion zu entschlüsseln.

4.3.2 Endozytotische Aktivität

DC nutzen, wie in der Einleitung bereits angeschnitten, verschiedene Mechanismen der Antigenaufnahme: Makropinozytose, Phagozytose (Inaba et al. 1993; Matsuno et al. 1996) und rezeptorvermittelte Endozytose (Levine, Chain 1992). Ihre höchste Aktivität diesbezüglich besitzen sie im unreifen Zustand, wohingegen eine Ausreifung zu einer starken Herabsetzung dieser Eigenschaft führt. Diese Beobachtung machten Sallusto et al. 1995, als sie im Zusammenhang einer Inkubation von DC mit TNF- α , IL-1, CD40L oder LPS eine verminderte Makropinozytose und eine Reduktion von Mannoserezeptoren bei gleichzeitigem Anstieg kostimulierender Moleküle feststellten (Sallusto et al. 1995). Sie schrieben diese Veränderung einer DC-Reifung zu. Zudem identifizierten sie den Mannoserezeptor als hauptverantwortlich für die gezielte Endozytose von FITC-Dextran.

Diese Methodik machten wir uns zunutze, um die Ergebnisse aus der vorangegangenen DC-Oberflächencharakterisierung funktionell zu überprüfen. Dabei zeigten die zytokin-vollgereiften moDC wie zu erwarten ein reduziertes Endozytoseverhalten. Mit Glykodelin behandelte moDC behielten jedoch ihre endozytotische Tätigkeit bei. Damit stimmen unsere phänotypischen Beobachtungen mit den funktionellen Ergebnissen überein und festigen die Theorie einer DC-Halbreife.

4.3.3 Lymphoproliferative Kapazität

Das Prinzip der gemischten Lymphozytenkultur besteht in der Proliferationsinduktion allogener Lymphozyten durch DC. In erster Linie ist dies zurückzuführen auf Stimulation der Lymphozyten durch von DC präsentierte Antigene. Das stärkste Potential zur T-Lymphozytenanregung besitzen wiederum reife dendritische Zellen (Cella et al. 1997). Dies ist auch in unseren BrdU-Experimenten deutlich zu sehen. Hingegen führte eine Vorinkubation mit Glykodelin zu einer deutlich reduzierten Stimulationsfähigkeit der moDC im Verhalten zu den Lymphozyten. Erklärbar ist dies womöglich durch die verminderte Expression des kostimulierenden CD86, wie wir in unserer Oberflächenmolekülcharakterisierung feststellen konnten. Wie bereits diskutiert, ist CD86 entscheidend beteiligt an der Verstärkung einer T-Zell-Immunantwort (Caux et al. 1994). Fehlt diese kostimulie-

rende Wirkung über CD28-Bindung auf den T-Zellen im Rahmen der Antigenerkennung, resultiert dies in einer verminderten Aktivierung und damit verringerter Immuneffektorfunktion der Lymphozyten (Kearney et al. 1994; Hernandez et al. 2001).

Grundsätzlich ist zu beachten, dass die Zielzellpopulation unserer Untersuchungen, nämlich aktivierte spezifische T-Zellen, auch durch unspezifische Bystander-Stimulation von benachbarten Zellen wie B-Lymphozyten oder NK überschätzt werden könnte. Da wir in unseren Versuchen keine Verfahren zur T-Zell-Isolierung angewandt haben, ist davon auszugehen, dass die gewonnenen PBMC entsprechend der normalen Blutverteilung typischerweise zu 75% T-Lymphozyten repräsentieren und die restlichen 25% der Zellkultur sich aus den oben genannten Zellen zusammensetzt. Darüber hinaus sind DC ihrerseits in der Lage, selbst B-Zellen und NK zu aktivieren (Dubois et al. 1997; Clark 1997; Fernandez 1999). Allerdings sind alle diese Effekte in Bezug auf unsere Untersuchungen wiederum aufgrund der insgesamt immer identisch vorherrschenden Testbedingungen als gleich einzustufen.

Neben der Aktivierung der Lymphozyten durch den direkten Zell-zu-Zell Kontakt ist jedoch zu berücksichtigen, dass auch bestimmte Zytokine Einfluss auf die T-Zellentwicklung nehmen können.

Solche Nebeneffekte wären etwa durch die Reifeinduktoren $\text{TNF-}\alpha$ und $\text{IL-1}\beta$ zu erwarten. So befördert $\text{TNF-}\alpha$ über die Reifung der dendritischen Zellen die gewollte T-stimulatorische Eigenschaft, wie in unseren Positivkontrollen zu beobachten. Außerdem steigert dieses Zytokin auch direkt die T-Zell-Proliferation über deren vermehrte Expression von IL-2-Rezeptoren und kostimulierende Effekte (Scheurich et al. 1987). IL-2 wirkt autokrin auf den T-Lymphozyten selbst und löst eine intrazelluläre Signalkaskade aus, die in der Aktivierung und klonalen Teilung der T-Zellen mündet. Auch $\text{IL-1}\beta$ fördert die T-Zellproliferation unter anderem über die verstärkte Produktion von IL-2 durch T-Lymphozyten (Hackett 1988). Eine signifikante Beeinflussung der Messdaten durch diese beiden stimulierenden Zytokine ist allerdings kaum zu erwarten, da der Ansatz der gemischten Lymphozytenkultur erst nach bereits abgelaufener Reifungsvorinkubation der DC von wenigstens 24 bzw. 48 Stunden erfolgte, die Halbwertszeiten für $\text{TNF-}\alpha$ jedoch unter 30 Minuten und für $\text{IL-1}\beta$ unter 60 Minuten liegen.

Nicht zuletzt deuten damit unsere Ergebnisse in den BrdU-Versuchen mit dem Verlust der T-stimulatorischen Kapazität ebenfalls auf eine verminderte funktionelle Aktivität der DC unter dem Einfluss von Glykodelin hin.

4.3.4 Sezerniertes Zytokinmuster

Zytokine stellen eine heterogene Gruppe hormonähnlicher, löslicher Proteine dar, die von verschiedenen Leukozyten sezerniert werden und ob ihrer pleiotropen regulatorischen Funktionen im menschlichen Körper ein komplexes Netzwerk der immunzellulären Kommunikation unterhalten (Balkwill, Burke 1989; Loppnow 2001). In Bezug auf das Priming von T-Lymphozyten stellen von dendritischen Zellen sezernierte Zytokine,

neben der effektiven Kostimulation via CD80/CD86, eine entscheidendes Kriterium dar (Pasare, Medzhitor 2004). Reife DC produzieren ein Reihe von Zytokinen und nehmen damit, wie einleitend erwähnt, Einfluss auf die Ausrichtung der T-Helfer-Immunantwort (de Jong et al. 2005). IL-12 ist hierbei als klassisches Th1-Zytokin beteiligt an der Differenzierung der Th0-Zelle (Hsieh et al. 1993; Manetti et al. 1993). Es fördert die Proliferation von T-Lymphozyten und NK-Zellen, unterstützt deren zytotoxische Aktivität und fördert die Interferon- γ -Produktion durch diese (Trinchieri 1998; Perussia et al. 1992). Neben diesen proinflammatorischen und immunregulatorischen Eigenschaften zeigt IL-12 auch eine starke anti-Tumor-Aktivität in Mausmodellen (Brunda et al. 1993; Nanni et al. 2001; Colombo, Trinchieri 2002). Für das Ovarialkarzinom werden ebenfalls ähnliche Effekte berichtet. So resultierte die IL-12-Behandlung von SCID-(*severe combined immunodeficiency*) Mäusen mit Ovarialkarzinom in einer signifikanten Regression bzw. verzögertem Wachstum des Tumors (Silver et al. 1999). Kürzlich zeigte eine andere Arbeitsgruppe, dass die Transfektion von IL-12 in die Ovarialkarzinomzelllinie SCOV3 deren Proliferation hemmt (Wang et al. 2006). Die Antitumoreigenschaft von IL-12 scheint komplex und noch weitgehend unverstanden, so werden neben inerten und antigenspezifischen Immunmechanismen auch antiangiogenetische Effekte diskutiert (Duda et al. 2000; Sunamura et al. 2000).

Neben der Induktion von Immunantworten sind DC über das vorherrschende Zytokinmilieu auch entscheidend beteiligt am Erhalt peripherer Toleranz. Ein wichtiger Akteur in diesem Zusammenhang scheint IL-10. Dieser Botenstoff gilt neben TGF- β als wichtigstes antientzündliches Zytokin. Seine direkte Wirkung auf T-Lymphozyten besteht vor allem in einer Hemmung der IL-2-Produktion durch diese (de Waal et al. 1993; Taga et al. 1993). Als Th2-Zytokin unterdrückt es die Synthese von IL-2 und stimuliert gleichzeitig die Proliferation von B-Zellen und deren Entwicklung hin zu Plasmazellen (Rousset et al. 1992).

Charakteristischerweise fördern speziell unreife DC durch sezerniertes IL-10 die Entwicklung von immunhemmenden, regulatorischen T-Zellen (Dhodapkar et al. 2001). So beschrieben unter anderem Jonuleit et al. das Auftreten von nichtproliferierenden T-Lymphozyten nach wiederholter Stimulation naiver, allogener CD4⁺ T-Zellen mit CD83⁺ dendritischen Zellen (Jonuleit et al. 2000; de Jong et al. 2005). Diese profunden immunsuppressiven Wirkungen beschäftigen viele Studien zu Tumoren. Neuere Daten für das Ovarialkarzinom stellen dieses Zytokin in Zusammenhang mit dessen Pathogenese. So fanden Mustea et al. für IL-10 erhöhte Level in Serum und Aszites von Ovarialkarzinompatientinnen im Vergleich zur Kontrollgruppe von Frauen mit benignen Erkrankungen (Mustea et al. 2006). Eine weitere Studie dieser Arbeitsgruppe bestätigt ebenfalls eine mögliche immunmodulierende Rolle für IL-10 in gynäkologischen Malignomen. So konnte eine signifikante Korrelation zwischen Tumordifferenzierung und IL-10-Konzentration in Ovarialkarzinomen festgestellt werden. Erhöhte IL-10-Level fanden sich vorwiegend bei schlecht- bzw. undifferenzierten Karzinomtypen (Mustea et al. 2009).

In unseren Ergebnissen zeigte sich eine deutliche Verschiebung des Zytokinsekretionsmusters der DC zugunsten von IL-10 als Antwort auf die Inkubation mit Glykodelin, wohingegen bei alleiniger Stimulation mit $\text{TNF-}\alpha/\text{IL-1}\beta$ eindeutig die Sekretion von IL-12 dominierte. Diese Resultate passen zu Studien mit dem bereits erwähnten SEA (van Liempt et al. 2007).

Als denkbare Quellen für die Zytokine muss man allerdings erneut Bystanderzellen diskutieren. In Frage kommt etwa für IL-10 die Sekretion durch bereits vorhandene regulatorische T-Zellen und B-Lymphozyten. Von B-Zellen wird berichtet, dass sie ihrerseits die IL-12-Sekretion durch DC unterdrücken können (Moulin et al. 2000). Ausschließen lässt sich in unserem Fall die generell mögliche IL-10-Produktion durch Makrophagen aufgrund der Reinheit der Zell-Präparation mit durchflusszytometrischer CD14-Negativität.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass als wahrscheinlichste Quelle aus unserer Sicht für IL-10 die Sekretion durch moDC in Betracht kommt, für welche wir einen immunsuppressiven Effekt durch die Vorbehandlung mit Glykodelin vermuten.

Offen bleibt, ob Glykodelin auch in der Lage ist, in moDC Apoptose auszulösen. Die Möglichkeit einer Apoptoseinduktion in Monozyten durch Glykodelin ist bisher nicht eindeutig geklärt und wird zum Teil kontrovers diskutiert (Mukhopadhyay et al. 2001; Tee et al. 2008). Die von uns beobachtete IL-10-Sekretion spricht zumindest gegen einen direkten zytopathischen Effekt von Glykodelin auf DC. Die angewandte Trypanausschlussmethode zur Testung der Zellviabilität offenbarte in unseren Versuchsreihen keinen signifikanten Zusammenhang zwischen Zellsterblichkeit und verwandter Glykodelinkonzentration. Lediglich in Testversuchen mit 50 μg Aszitesglykodelin zeigte sich lichtmikroskopisch eine erhöhte Ratio avitaler Zellen.

4.3.5 Zusammenfassung

Betrachtet man die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit, so lassen sich folgende Beobachtungen zusammenfassen: tumorassoziiertes Glykodelin aus malignem Ovarialkarzinomaszites wirkt auf monozytenabgeleitete dendritische Zellen, indem es diese vermutlich in einen halbreifen Aktivierungszustand versetzt und damit möglicherweise eine effektive, gegen den Tumor gerichtete Immunantwort begrenzt. Es mehrten sich die Hinweise auf ein Modell, in dem Glykodelin durch seine einmalige Glykosilierungsstruktur über die Interaktion mit dem Rezeptor DC-SIGN diesen semimaturen DC-Typus befördert. Diese halbreifen DC dämpfen über die Schaffung eines tolerogen geprägten Zytokinmilieus die Immunstimulation durch T-Lymphozyten.

4.3.6 Perspektiven in Forschung und Klinik

Unsere Experimente eröffnen eine neue Sichtweise auf das Glykoprotein Glykodelin. Bekannt vor allem für seine kontrazeptive Rolle im Fertilisationsgeschehen sind die immunsuppressiven Fähigkeiten bisher vor allem erforscht in Zusammenhang mütterlicher

Toleranzmechanismen an der fetomaternalen Interphase. Genauere Wirkungseffekte beziehen sich vorwiegend auf T- und B-Lymphozyten sowie Natürliche Killerzellen. Diese Experimente untersuchten bisher nicht eine potentielle Wirkung auf DC, obwohl über spezifische Glykodelinrezeptoren auf Monozyten berichtet wurde (Miller et al. 1998). Auch zeichnen sich Monozyten durch eine tragende Rolle in dezipualen Toleranzmechanismen gegenüber dem sich entwickelnden Fetus aus (Heikkinen, 2003). So nehmen sie Einfluss über die Sekretion immunmodulierender Zytokine (Gustafsson 2006). Ähnliche Ergebnisse erzielten Untersuchungen in unserem Labor erst kürzlich in Versuchen mit Glykodelin A und moDC (Scholz, 2008). Dabei zeigte sich eine Immunmodulation im Sinne einer verminderten lymphostimulativen Kapazität der vorbehandelten moDC sowie einer verstärkten Sekretion von IL-10.

Neben der Schwangerschaft wird periphere Toleranz durch DC ebenfalls in der Karzinogenese diskutiert. Dort beschäftigt die Durchbrechung immunologischer Escape-Mechanismen zahlreiche klinische Studien mit DC. Ziel einer sogenannten Tumorzellvakzine ist es, tumorspezifische Immunantworten unter optimaler Aktivierung von DC zu generieren. Die hier vorliegenden Ergebnisse liefern morphologische und funktionelle Daten die auf einen dendritischen Toleranzmechanismus, induziert durch Ovarialkarzinomglykodelin, deuten. Unsere Resultate können zu einem besseren Verständnis für das tumorimmunologische Mikroumfeld des Ovarialkarzinoms beitragen und möglicherweise die Entwicklung effektiver Immuntherapiestrategien unterstützen.

Gleichzeitig werden weitere Fragen aufgeworfen. So sollte die Wirkung von Glykodelin aus ovariellm Karzinomaszites auch auf weitere Immunzellen wie etwa NK als Vertreter der angeborenen Abwehr untersucht werden, um gegebenenfalls weitere Parallelen zu Glykodelin A und seinen immunsuppressiven Eigenschaften aufzudecken. Vor allem im Hinblick auf mögliche Rezeptoridentifikationen ist auch die detaillierte Revelation der aszitesglykodelinen Zuckerstrukturen unerlässlich. Ebenso erfordert die Aufschlüsselung intrazellulärer Signaltransduktionswege weitergehende Studien.

5 Literaturverzeichnis

- Appelmelk BJ**, Van D, I, van Vliet SJ, Vandenbroucke-Grauls CM, Geijtenbeek TB, van Kooyk Y. Cutting edge: carbohydrate profiling identifies new pathogens that interact with dendritic cell-specific ICAM-3-grabbing nonintegrin on dendritic cells. *J Immunol* 2003; 170(4):1635-1639.
- Balkwill FR**, Burke F. The cytokine network. *Immunol Today* 1989; 10(9):299-304.
- Banchereau J**, Steinman RM. Dendritic cells and the control of immunity. *Nature* 1998; 392(6673):245-252.
- Banchereau J**, Briere F, Caux C, Davoust J, Lebecque S, Liu YJ et al. Immunobiology of dendritic cells. *Annu Rev Immunol* 2000; 18:767-811.
- Bast RC**, Jr., Klug TL, St John E, Jenison E, Niloff JM, Lazarus H et al. A radioimmunoassay using a monoclonal antibody to monitor the course of epithelial ovarian cancer. *N Engl J Med* 1983; 309(15):883-887.
- Bast RC**, Jr., Badgwell D, Lu Z, Marquez R, Rosen D, Liu J et al. New tumor markers: CA125 and beyond. *Int J Gynecol Cancer* 2005; 15 Suppl 3:274-281.
- Bender A**, Sapp M, Schuler G, Steinman RM, Bhardwaj N. Improved methods for the generation of dendritic cells from nonproliferating progenitors in human blood. *J Immunol Methods* 1996; 196(2):121-135.
- Bernard A**, Boumsell L, Hill C. Joint report of the First International Workshop on Human Leucocyte Antigens by the investigators of the participating laboratories. Leucocyte Typing – Human leucocyte differentiation antigens detected by monoclonal antibodies 1984. Springer-Verlag; Berlin 1984:9-135.
- Bischof A**, Briese V, Richter DU, Bergemann C, Friese K, Jeschke U. Measurement of glycodefin A in fluids of benign ovarian cysts, borderline tumours and malignant ovarian cancer. *Anticancer Res* 2005; 25(3A):1639-1644.
- Bohn H**, Kraus W, Winckler W. New soluble placental tissue proteins: their isolation, characterization, localization and quantification. *Placenta Suppl* 1982; 4:67-81.
- Bolton AE**, Pinto-Furtado LG, Andrew CE, Chapman MG. Measurement of the pregnancy-associated proteins, placental protein 14 and pregnancy-associated plasma protein A in human seminal plasma. *Clin Reprod Fertil* 1986; 4(3):233-240.
- Boruchov AM**, Heller G, Veri MC, Bonvini E, Ravetch JV, Young JW. Activating and inhibitory IgG Fc receptors on human DCs mediate opposing functions. *J Clin Invest* 2005; 115(10):2914-2923.
- Brigl M**, Bry L, Kent SC, Gumperz JE, Brenner MB. Mechanism of CD1d-restricted natural killer T cell activation during microbial infection. *Nat Immunol* 2003; 4(12):1230-1237.
- Bruna MJ**, Luistro L, Warrier RR, Wright RB, Hubbard BR, Murphy M et al. Antitumor and antimetastatic activity of interleukin 12 against murine tumors. *J Exp Med* 1993; 178(4):1223-1230.
- Bugres A**, Schmalfeldt B: Ovarian cancer: Diagnosis und treatment. *Deutsches Ärzteblatt Int* 2011; 108(38):635-41.
- Caux C**, Massacrier C, Vanbervliet B, Dubois B, Van Kooten C, Durand I et al. Activation of human dendritic cells through CD40 cross-linking. *J Exp Med* 1994; 180(4):1263-1272.
- Caux C**, Vanbervliet B, Massacrier C, Azuma M, Okumura K, Lanier LL et al. B70/B7-2 is identical to CD86 and is the major functional ligand for CD28 expressed on human dendritic cells. *J Exp Med* 1994; 180(5):1841-1847.

- Cella M**, Sallusto F, Lanzavecchia A. Origin, maturation and antigen presenting function of dendritic cells. *Curr Opin Immunol* 1997; 9(1):10-16.
- Chiu PC**, Koistinen R, Koistinen H, Seppala M, Lee KF, Yeung WS. Binding of zona binding inhibitory factor-1 (ZIF-1) from human follicular fluid on spermatozoa. *J Biol Chem* 2003; 278(15):13570-13577.
- Chiu PC**, Chung MK, Tsang HY, Koistinen R, Koistinen H, Seppala M et al. Glycodelin-S in human seminal plasma reduces cholesterol efflux and inhibits capacitation of spermatozoa. *J Biol Chem* 2005; 280(27):25580-25589.
- Clark EA**. Regulation of B lymphocytes by dendritic cells. *J Exp Med* 1997; 185(5):801-803.
- Colombo MP**, Trinchieri G. Interleukin-12 in anti-tumor immunity and immunotherapy. *Cytokine Growth Factor Rev* 2002; 13(2):155-168.
- Crawford K**, Gabuzda D, Pantazopoulos V, Xu J, Clement C, Reinherz E et al. Circulating CD2+ monocytes are dendritic cells. *J Immunol* 1999; 163(11):5920-5928.
- Curiel TJ**, Coukos G, Zou L, Alvarez X, Cheng P, Mottram P et al. Specific recruitment of regulatory T cells in ovarian carcinoma fosters immune privilege and predicts reduced survival. *Nat Med* 2004; 10(9):942-949.
- Curtis BM**, Scharnowske S, Watson AJ. Sequence and expression of a membrane-associated C-type lectin that exhibits CD4-independent binding of human immunodeficiency virus envelope glycoprotein gp120. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1992; 89(17):8356-8360.
- D'Andrea A**, Ma X, Aste-Amezaga M, Paganin C, Trinchieri G. Stimulatory and inhibitory effects of interleukin (IL)-4 and IL-13 on the production of cytokines by human peripheral blood mononuclear cells: priming for IL-12 and tumor necrosis factor alpha production. *J Exp Med* 1995; 181(2):537-546.
- de Jong EC**, Vieira PL, Kalinski P, Schuitmaker JH, Tanaka Y, Wierenga EA et al. Microbial compounds selectively induce Th1 cell-promoting or Th2 cell-promoting dendritic cells in vitro with diverse th cell-polarizing signals. *J Immunol* 2002; 168(4):1704-1709.
- de Jong EC**, Smits HH, Kapsenberg ML. Dendritic cell-mediated T cell polarization. *Springer Semin Immunopathol* 2005; 26(3):289-307.
- de Waal MR**, Yssel H, de Vries JE. Direct effects of IL-10 on subsets of human CD4+ T cell clones and resting T cells. Specific inhibition of IL-2 production and proliferation. *J Immunol* 1993; 150(11):4754-4765.
- Dell A**, Morris HR, Easton RL, Panico M, Patankar M, Oehniger S et al. Structural analysis of the oligosaccharides derived from glycodelin, a human glycoprotein with potent immunosuppressive and contraceptive activities. *J Biol Chem* 1995; 270(41):24116-24126.
- Dhodapkar MV**, Steinman RM, Krasovsky J, Munz C, Bhardwaj N. Antigen-specific inhibition of effector T cell function in humans after injection of immature dendritic cells. *J Exp Med* 2001; 193(2):233-238.
- Dubois B**, Vanbervliet B, Fayette J, Massacrier C, Van Kooten C, Briere F et al. Dendritic cells enhance growth and differentiation of CD40-activated B lymphocytes. *J Exp Med* 1997; 185(5):941-951.
- Duda DG**, Sunamura M, Lozonchi L, Kodama T, Egawa S, Matsumoto G et al. Direct in vitro evidence and in vivo analysis of the antiangiogenesis effects of interleukin 12. *Cancer Res* 2000; 60(4):1111-1116.
- Eisenthal A**, Polyvkin N, Bramante-Schreiber L, Misonznik F, Hassner A, Lifschitz-Mercer B. Expression of dendritic cells in ovarian tumors correlates with clinical outcome in patients with ovarian cancer. *Hum Pathol* 2001; 32(8):803-807.
- Engering A**, Geijtenbeek TB, van Vliet SJ, Wijers M, van Liempt E, Demareux N et al. The dendritic cell-specific adhesion receptor DC-SIGN internalizes antigen for presentation to T cells. *J Immunol* 2002; 168(5):2118-2126.
- Fathalla MF**. Incessant ovulation--a factor in ovarian neoplasia? *Lancet* 1971; 2(7716):163.
- Ferlazzo G**, Tsang ML, Moretta L, Melioli G, Steinman RM, Munz C. Human dendritic cells activate resting natural killer (NK) cells and are recognized via the NKp30 receptor by activated NK cells. *J Exp Med* 2002; 195(3):343-351.

- Ferlazzo G**, Pack M, Thomas D, Paludan C, Schmid D, Strowig T et al. Distinct roles of IL-12 and IL-15 in human natural killer cell activation by dendritic cells from secondary lymphoid organs. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004; 101(47):16606-16611.
- Fernandez NC**, Lozier A, Flament C, Ricciardi-Castagnoli P, Bellet D, Suter M et al. Dendritic cells directly trigger NK cell functions: cross-talk relevant in innate anti-tumor immune responses in vivo. *Nat Med* 1999; 5(4):405-411.
- Figdor CG**, van Kooyk Y, Adema GJ. C-type lectin receptors on dendritic cells and Langerhans cells. *Nat Rev Immunol* 2002; 2(2):77-84.
- Flower DR**, North AC, Sansom CE. The lipocalin protein family: structural and sequence overview. *Biochim Biophys Acta* 2000; 1482(1-2):9-24.
- Freeman GJ**, Gribben JG, Boussiotis VA, Ng JW, Restivo VA, Jr., Lombard LA et al. Cloning of B7-2: a CTLA-4 counter-receptor that costimulates human T cell proliferation. *Science* 1993; 262(5135):909-911.
- Fujii S**, Shimizu K, Kronenberg M, Steinman RM. Prolonged IFN-gamma-producing NKT response induced with alpha-galactosylceramide-loaded DCs. *Nat Immunol* 2002; 3(9):867-874.
- Geijtenbeek TB**, Torensma R, van Vliet SJ, van Duijnhoven GC, Adema GJ, van Kooyk Y et al. Identification of DC-SIGN, a novel dendritic cell-specific ICAM-3 receptor that supports primary immune responses. *Cell* 2000; 100(5):575-585.
- Geijtenbeek TB**, Krooshoop DJ, Bleijs DA, van Vliet SJ, van Duijnhoven GC, Grabovsky V et al. DC-SIGN-ICAM-2 interaction mediates dendritic cell trafficking. *Nat Immunol* 2000; 1(4):353-357.
- Geijtenbeek TB**, Kwon DS, Torensma R, van Vliet SJ, van Duijnhoven GC, Middel J et al. DC-SIGN, a dendritic cell-specific HIV-1-binding protein that enhances trans-infection of T cells. *Cell* 2000; 100(5):587-597.
- Godfrey DI**, MacDonald HR, Kronenberg M, Smyth MJ, Van Kaer L. NKT cells: what's in a name? *Nat Rev Immunol* 2004; 4(3):231-237.
- Goff BA**, Mandel L, Muntz HG, Melancon CH. Ovarian carcinoma diagnosis. *Cancer* 2000; 89(10):2068-2075.
- Granucci F**, Zanoni I, Pavelka N, Van Dommelen SL, Andoniu CE, Belardelli F et al. A contribution of mouse dendritic cell-derived IL-2 for NK cell activation. *J Exp Med* 2004; 200(3):287-295.
- Grütz G**. New insights into the molecular mechanism of interleukin-10-mediated immunosuppression. *Journal of leukocyte biology* 2005; 77(1):3-15.
- Guermónprez P**, Valladeau J, Zitvogel L, Thery C, Amigorena S. Antigen presentation and T cell stimulation by dendritic cells. *Annu Rev Immunol* 2002; 20:621-667.
- Gustafsson C**, Hummerdal P, Matthiesen L, Berg G, Ekerfelt C, Ernerudh J. Cytokine secretion in decidual mononuclear cells from term human pregnancy with or without labour: ELISPOT detection of IFN-gamma, IL-4, IL-10, TGF-beta and TNF-alpha. *J Reprod Immunol* 2006; 71(1):41-56.
- Hackett RJ**, Davis LS, Lipsky PE. Comparative effects of tumor necrosis factor-alpha and IL-1 beta on mitogen-induced T cell activation. *J Immunol* 1988; 140(8):2639-2644.
- Hathcock KS**, Laszlo G, Pucillo C, Linsley P, Hodes RJ. Comparative analysis of B7-1 and B7-2 costimulatory ligands: expression and function. *J Exp Med* 1994; 180(2):631-640.
- Havrilesky LJ**, Whitehead CM, Rubatt JM, Cheek RL, Groelke J, He Q et al. Evaluation of biomarker panels for early stage ovarian cancer detection and monitoring for disease recurrence. *Gynecol Oncol* 2008; 110(3):374-382.
- Heath WR**, Belz GT, Behrens GM, Smith CM, Forehan SP, Parish IA et al. Cross-presentation, dendritic cell subsets, and the generation of immunity to cellular antigens. *Immunol Rev* 2004; 199:9-26.
- Heintz AP**, Odicino F, Maisonneuve P, Quinn MA, Benedet JL, Creasman WT et al. Carcinoma of the ovary. FIGO 6th Annual Report on the Results of Treatment in Gynecological Cancer. *Int J Gynaecol Obstet* 2006; 95 Suppl 1:S161-S192.
- Hernandez J**, Aung S, Redmond WL, Sherman LA. Phenotypic and functional analysis of CD8(+) T cells undergoing peripheral deletion in response to cross-presentation of self-antigen. *J Exp Med* 2001; 194(6):707-717.

- Hirano N**, Butler MO, Xia Z, Ansen S, Bergwelt-Baildon MS, Neuberg D et al. Engagement of CD83 ligand induces prolonged expansion of CD8+ T cells and preferential enrichment for antigen specificity. *Blood* 2006; 107(4):1528-1536.
- Hochrein H**, Shortman K, Vremec D, Scott B, Hertzog P, O'Keeffe M. Differential production of IL-12, IFN-alpha, and IFN-gamma by mouse dendritic cell subsets. *J Immunol* 2001; 166(9):5448-5455.
- Horowitz IR**, Cho C, Song M, Flowers LC, Santanam N, Parthasarathy S et al. Increased glycodefin levels in gynecological malignancies. *Int J Gynecol Cancer* 2001; 11(3):173-179.
- Hsieh CS**, Macatonia SE, Tripp CS, Wolf SF, O'Garra A, Murphy KM. Development of TH1 CD4+ T cells through IL-12 produced by Listeria-induced macrophages. *Science* 1993; 260(5107):547-549.
- Inaba K**, Inaba M, Naito M, Steinman RM. Dendritic cell progenitors phagocytose particulates, including bacillus Calmette-Guerin organisms, and sensitize mice to mycobacterial antigens in vivo. *J Exp Med* 1993; 178(2):479-488.
- Janeway CA, Jr.**, Travers P, Walport M, Shlomchik MJ. Immunobiology-disease the immune system in health and. Immunobiology – the immune system in health and disease 2005; 6th edition.
- Jansen JH**, Wientjens GJ, Fibbe WE, Willemze R, Kluin-Nelemans HC. Inhibition of human macrophage colony formation by interleukin 4. *J Exp Med* 1989; 170(2):577-582.
- Jarrossay D**, Napolitani G, Colonna M, Sallusto F, Lanzavecchia A. Specialization and complementarity in microbial molecule recognition by human myeloid and plasmacytoid dendritic cells. *Eur J Immunol* 2001; 31(11):3388-3393.
- Jeschke U**, Bischof A, Speer R, Briesse V, Richter DU, Bergemann C et al. Development of monoclonal and polyclonal antibodies and an ELISA for the determination of glycodefin in human serum, amniotic fluid and cystic fluid of benign and malignant ovarian tumors. *Anticancer Res* 2005; 25(3A):1581-1589.
- Jeschke U**, Mylonas I, Kunert-Keil C, Stahn R, Scholz C, Janni W et al. Immunohistochemistry, glycosylation and immunosuppression of glycodefin in human ovarian cancer. *Histochem Cell Biol* 2009; 131(2):283-295.
- Jonuleit H**, Kuhn U, Muller G, Steinbrink K, Paragnik L, Schmitt E et al. Pro-inflammatory cytokines and prostaglandins induce maturation of potent immunostimulatory dendritic cells under fetal calf serum-free conditions. *Eur J Immunol* 1997; 27(12):3135-3142.
- Jonuleit H**, Schmitt E, Schuler G, Knop J, Enk AH. Induction of interleukin 10-producing, nonproliferating CD4(+) T cells with regulatory properties by repetitive stimulation with allogeneic immature human dendritic cells. *J Exp Med* 2000; 192(9):1213-1222.
- Joshi SG**, Smith RA, Stokes DK. A progestagen-dependent endometrial protein in human amniotic fluid. *J Reprod Fertil* 1980; 60(2):317-321.
- Julkunen M**, Wahlstrom T, Seppala M, Koistinen R, Koskimies A, Stenman UH et al. Detection and localization of placental protein 14-like protein in human seminal plasma and in the male genital tract. *Arch Androl* 1984; 12 Suppl:59-67.
- Julkunen M**, Rutanen EM, Koskimies A, Ranta T, Bohn H, Seppala M. Distribution of placental protein 14 in tissues and body fluids during pregnancy. *Br J Obstet Gynaecol* 1985; 92(11):1145-1151.
- Julkunen M**, Koistinen R, Sjoberg J, Rutanen EM, Wahlstrom T, Seppala M. Secretory endometrium synthesizes placental protein 14. *Endocrinology* 1986; 118(5):1782-1786.
- Julkunen M**. Human decidua synthesizes placental protein 14 (PP14) in vitro. *Acta Endocrinol (Copenh)* 1986; 112(2):271-277.
- Julkunen M**, Seppala M, Janne OA. Complete amino acid sequence of human placental protein 14: a progesterone-regulated uterine protein homologous to beta-lactoglobulins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1988; 85(23):8845-8849.
- Kalinski P**, Schuitemaker JH, Hilken CM, Kapsenberg ML. Prostaglandin E2 induces the final maturation of IL-12-deficient CD1a+CD83+ dendritic cells: the levels of IL-12 are determined during the final dendritic cell maturation and are resistant to further modulation. *J Immunol* 1998; 161(6):2804-2809.
- Kalinski P**, Hilken CM, Wierenga EA, Kapsenberg ML. T-cell priming by type-1 and type-2 polarized dendritic cells: the concept of a third signal. *Immunol Today* 1999; 20(12):561-567.

- Kalinski P**, Smits HH, Schuitemaker JH, Vieira PL, van Eijk M, de Jong EC et al. IL-4 is a mediator of IL-12p70 induction by human Th2 cells: reversal of polarized Th2 phenotype by dendritic cells. *J Immunol* 2000; 165(4):1877-1881.
- Kalinski P**, Vieira PL, Schuitemaker JH, de Jong EC, Kapsenberg ML. Prostaglandin E(2) is a selective inducer of interleukin-12 p40 (IL-12p40) production and an inhibitor of bioactive IL-12p70 heterodimer. *Blood* 2001; 97(11):3466-3469.
- Kamarainen M**, Leivo I, Koistinen R, Julkunen M, Karvonen U, Rutanen EM et al. Normal human ovary and ovarian tumors express glycodeclin, a glycoprotein with immunosuppressive and contraceptive properties. *Am J Pathol* 1996; 148(5):1435-1443.
- Kamarainen M**, Halttunen M, Koistinen R, von Boguslawsky K, von Smitten K, Andersson LC et al. Expression of glycodeclin in human breast and breast cancer. *Int J Cancer* 1999; 83(6):738-742.
- Kapsenberg ML**. Dendritic-cell control of pathogen-driven T-cell polarization. *Nat Rev Immunol* 2003; 3(12):984-993.
- Karande AA**, Mukhopadhyay D, Jayachandran R, Sundarraj S, Alok A. Mechanism of the immunomodulatory activity of glycodeclin. *Indian J Physiol Pharmacol* 2005; 49(3):271-283.
- Karri S**, Mukhopadhyay D, Jing L, Karande AA. Characterization of monoclonal antibodies to glycodeclin and recombinant glycodeclin. *Histochem J* 2000; 32(12):711-716.
- Kato M**, Neil TK, Fearnley DB, McLellan AD, Vuckovic S, Hart DN. Expression of multilectin receptors and comparative FITC-dextran uptake by human dendritic cells. *Int Immunol* 2000; 12(11):1511-1519.
- Kearney ER**, Pape KA, Loh DY, Jenkins MK. Visualization of peptide-specific T cell immunity and peripheral tolerance induction in vivo. *Immunity* 1994; 1(4):327-339.
- Koistinen H**, Koistinen R, Dell A, Morris HR, Easton RL, Patankar MS et al. Glycodeclin from seminal plasma is a differentially glycosylated form of contraceptive glycodeclin-A. *Mol Hum Reprod* 1996; 2(10):759-765.
- Koistinen H**, Koistinen R, Kamarainen M, Salo J, Seppala M. Multiple forms of messenger ribonucleic acid encoding glycodeclin in male genital tract. *Lab Invest* 1997; 76(5):683-690.
- Langerhans P**. Über die Nerven der menschlichen Haut. *Archive für pathologische Anatomie und Physiologie*, Berlin 1868; 44.
- Lapid K**, Sharon N. Meet the multifunctional and sexy glycoforms of glycodeclin. *Glycobiology* 2006; 16(3):39R-45R.
- Levine TP**, Chain BM. Endocytosis by antigen presenting cells: dendritic cells are as endocytically active as other antigen presenting cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1992; 89(17):8342-8346.
- Loppnow H**. Zytokine: Klassifikation, Rezeptoren, Wirkungsmechanismen. *Der Internist* 2001; 42 (1):13-27.
- Luft T**, Jefford M, Luetjens P, Hochrein H, Masterman KA, Maliszewski C et al. IL-1 beta enhances CD40 ligand-mediated cytokine secretion by human dendritic cells (DC): a mechanism for T cell-independent DC activation. *J Immunol* 2002; 168(2):713-722.
- Lutz MB**, Schuler G. Immature, semi-mature and fully mature dendritic cells: which signals induce tolerance or immunity? *Trends Immunol* 2002; 23(9):445-449.
- Macagno A**, Napolitani G, Lanzavecchia A, Sallusto F. Duration, combination and timing: the signal integration model of dendritic cell activation. *Trends Immunol* 2007; 28(5):227-233.
- Manetti R**, Parronchi P, Giudizi MG, Piccinni MP, Maggi E, Trinchieri G et al. Natural killer cell stimulatory factor (interleukin 12 [IL-12]) induces T helper type 1 (Th1)-specific immune responses and inhibits the development of IL-4-producing Th cells. *J Exp Med* 1993; 177(4):1199-1204.
- Matsuno K**, Ezaki T, Kudo S, Uehara Y. A life stage of particle-laden rat dendritic cells in vivo: their terminal division, active phagocytosis, and translocation from the liver to the draining lymph. *J Exp Med* 1996; 183(4):1865-1878.
- Matzinger P**. Tolerance, danger, and the extended family. *Annu Rev Immunol* 1994; 12:991-1045.
- Matzinger P**. An innate sense of danger. *Ann N Y Acad Sci* 2002; 961:341-342.

- McAdam AJ**, Schweitzer AN, Sharpe AH. The role of B7 co-stimulation in activation and differentiation of CD4+ and CD8+ T cells. *Immunol Rev* 1998; 165:231-247.
- Medzhitov R**, Preston-Hurlburt P, Janeway CA, Jr. A human homologue of the Drosophila Toll protein signals activation of adaptive immunity. *Nature* 1997; 388(6640):394-397.
- Mempel TR**, Henrickson SE, von Andrian UH. T-cell priming by dendritic cells in lymph nodes occurs in three distinct phases. *Nature* 2004; 427(6970):154-159.
- Miller RE**, Fayer JD, Chakraborty S, Weber MC, Tykocinski ML. A receptor for the lipocalin placental protein 14 on human monocytes. *FEBS Lett* 1998; 436(3):455-460.
- Morris HR**, Dell A, Easton RL, Panico M, Koistinen H, Koistinen R et al. Gender-specific glycosylation of human glycodefin affects its contraceptive activity. *J Biol Chem* 1996; 271(50):32159-32167.
- Moulin V**, Andris F, Thielemans K, Maliszewski C, Urbain J, Moser M. B lymphocytes regulate dendritic cell (DC) function in vivo: increased interleukin 12 production by DCs from B cell-deficient mice results in T helper cell type 1 deviation. *J Exp Med* 2000; 192(4):475-482.
- Mukhopadhyay D**, Sundereshan S, Rao C, Karande AA. Placental protein 14 induces apoptosis in T cells but not in monocytes. *J Biol Chem* 2001; 276(30):28268-28273.
- Munn DH**. Tolerogenic antigen-presenting cells. *Ann N Y Acad Sci* 2002; 961:343-345.
- Mustea A**, Konsgen D, Braicu EI, Pirvulescu C, Sun P, Sofroni D et al. Expression of IL-10 in patients with ovarian carcinoma. *Anticancer Res* 2006; 26(2C):1715-1718.
- Mustea A**, Braicu EI, Koensgen D, Yuan S, Sun PM, Stamatian F et al. Monitoring of IL-10 in the serum of patients with advanced ovarian cancer: results from a prospective pilot-study. *Cytokine* 2009; 45(1):8-11.
- Nanni P**, Nicoletti G, De Giovanni C, Landuzzi L, Di Carlo E, Cavallo F et al. Combined allogeneic tumor cell vaccination and systemic interleukin 12 prevents mammary carcinogenesis in HER-2/neu transgenic mice. *J Exp Med* 2001; 194(9):1195-1205.
- Narod SA**, Risch H, Moslehi R, Dorum A, Neuhausen S, Olsson H et al. Oral contraceptives and the risk of hereditary ovarian cancer. Hereditary Ovarian Cancer Clinical Study Group. *N Engl J Med* 1998; 339(7):424-428.
- National Cancer Institute**. SEER – Surveillance, Epidemiology and End Results. 2006.
- Nonaka M**, Ma BY, Murai R, Nakamura N, Baba M, Kawasaki N et al. Glycosylation-dependent interactions of C-type lectin DC-SIGN with colorectal tumor-associated Lewis glycans impair the function and differentiation of monocyte-derived dendritic cells. *J Immunol* 2008; 180(5):3347-3356.
- Oehninger S**, Coddington CC, Hodgen GD, Seppala M. Factors affecting fertilization: endometrial placental protein 14 reduces the capacity of human spermatozoa to bind to the human zona pellucida. *Fertil Steril* 1995; 63(2):377-383.
- Okamoto N**, Uchida A, Takakura K, Kariya Y, Kanzaki H, Riittinen L et al. Suppression by human placental protein 14 of natural killer cell activity. *Am J Reprod Immunol* 1991; 26(4):137-142.
- Olishevsky SV**, Sevko ALSVO. NKT: Dual Role in tumor immunosurveillance and implications in cancer therapy. Fournier, N V :NKT: Roles, Interactions, Interventions 2008; 2008:103-128.
- Boyle, P.**, Levin, B. World Cancer Report . 217-2. 2008. Ref Type: Report
- Partridge E**, Kreimer AR, Greenlee RT, Williams C, Xu JL, Church TR et al. Results from four rounds of ovarian cancer screening in a randomized trial. *Obstet Gynecol* 2009; 113(4):775-782.
- Pasare C**, Medzhitov R. Toll-dependent control mechanisms of CD4 T cell activation. *Immunity* 2004; 21(5):733-741.
- Perussia B**, Chan SH, D'Andrea A, Tsuji K, Santoli D, Pospisil M et al. Natural killer (NK) cell stimulatory factor or IL-12 has differential effects on the proliferation of TCR-alpha beta+, TCR-gamma delta+ T lymphocytes, and NK cells. *J Immunol* 1992; 149(11):3495-3502.
- Pockley AG**, Mowles EA, Stoker RJ, Westwood OM, Chapman MG, Bolton AE. Suppression of in vitro lymphocyte reactivity to phytohemagglutinin by placental protein 14. *J Reprod Immunol* 1988; 13(1):31-39.

- Pockley AG**, Bolton AE. Placental protein 14 (PP14) inhibits the synthesis of interleukin-2 and the release of soluble interleukin-2 receptors from phytohaemagglutinin-stimulated lymphocytes. *Clin Exp Immunol* 1989; 77(2):252-256.
- Poddar AS**, Kim JG, Gill KP, Bates BN, Santanam N, Rock JA et al. Generation and characterization of a polyclonal antipeptide antibody to human glycodelin. *Fertil Steril* 1998; 69(3):543-548.
- Prechtel AT**, Steinkasserer A. CD83: an update on functions and prospects of the maturation marker of dendritic cells. *Arch Dermatol Res* 2007; 299(2):59-69.
- Rabinovich GA**, Gabrilovich D, Sotomayor EM. Immunosuppressive strategies that are mediated by tumor cells. *Annu Rev Immunol* 2007; 25:267-296.
- Rachmilewitz J**, Riely GJ, Tykocinski ML. Placental protein 14 functions as a direct T-cell inhibitor. *Cell Immunol* 1999; 191(1):26-33.
- Rachmilewitz J**, Riely GJ, Huang JH, Chen A, Tykocinski ML. A rheostatic mechanism for T-cell inhibition based on elevation of activation thresholds. *Blood* 2001; 98(13):3727-3732.
- Rachmilewitz J**, Borovsky Z, Riely GJ, Miller R, Tykocinski ML. Negative regulation of T cell activation by placental protein 14 is mediated by the tyrosine phosphatase receptor CD45. *J Biol Chem* 2003; 278(16):14059-14065.
- Randolph GJ**, Beaulieu S, Lebecque S, Steinman RM, Muller WA. Differentiation of monocytes into dendritic cells in a model of transendothelial trafficking. *Science* 1998; 282(5388):480-483.
- Randolph GJ**, Sanchez-Schmitz G, Liebman RM, Schakel K. The CD16(+) (FcγRIII(+)) subset of human monocytes preferentially becomes migratory dendritic cells in a model tissue setting. *J Exp Med* 2002; 196(4):517-527.
- Reid CD**, Stackpoole A, Meager A, Tikerpaie J. Interactions of tumor necrosis factor with granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and other cytokines in the regulation of dendritic cell growth in vitro from early bipotent CD34+ progenitors in human bone marrow. *J Immunol* 1992; 149(8):2681-2688.
- Reimer T**, Koczan D, Briesse V, Friesse K, Richter D, Thiesen HJ et al. Absolute quantification of human chorionic gonadotropin-beta mRNA with TaqMan detection. 4. *Mol Biotechnol* 2000; 14(1):47-57.
- Riittinen L**, Julkunen M, Seppala M, Koistinen R, Huhtala ML. Purification and characterization of endometrial protein PP14 from mid-trimester amniotic fluid. *Clin Chim Acta* 1989; 184(1):19-29.
- Riittinen L**, Narvanen O, Virtanen I, Seppala M. Monoclonal antibodies against endometrial protein PP14 and their use for purification and radioimmunoassay of PP14. *J Immunol Methods* 1991; 136(1):85-90.
- Risch HA**, McLaughlin JR, Cole DE, Rosen B, Bradley L, Kwan E et al. Prevalence and penetrance of germline BRCA1 and BRCA2 mutations in a population series of 649 women with ovarian cancer. *Am J Hum Genet* 2001; 68(3):700-710.
- Robert-Koch-Institut (RKI)**. Krebs in Deutschland – Häufigkeiten und Trends. 13-14. 2008.
- Romani N**, Gruner S, Brang D, Kampgen E, Lenz A, Trockenbacher B et al. Proliferating dendritic cell progenitors in human blood. *J Exp Med* 1994; 180(1):83-93.
- Rossi M**, Young JW. Human dendritic cells: potent antigen-presenting cells at the crossroads of innate and adaptive immunity. *J Immunol* 2005; 175(3):1373-1381.
- Rousset F**, Garcia E, Defrance T, Peronne C, Vezzio N, Hsu DH et al. Interleukin 10 is a potent growth and differentiation factor for activated human B lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1992; 89(5): 1890-1893.
- Sakaguchi S**, Yamaguchi T, Nomura T, Ono M. Regulatory T cells and immune tolerance. *Cell* 2008; 133(5):775-787.
- Sallusto F**, Cella M, Danieli C, Lanzavecchia A. Dendritic cells use macropinocytosis and the mannose receptor to concentrate macromolecules in the major histocompatibility complex class II compartment: downregulation by cytokines and bacterial products. *J Exp Med* 1995; 182(2):389-400.
- Sallusto F**, Nicolo C, De Maria R, Corinti S, Testi R. Ceramide inhibits antigen uptake and presentation by dendritic cells. *J Exp Med* 1996; 184(6):2411-2416.
- Sanchez-Sanchez N**, Riol-Blanco L, Rodriguez-Fernandez JL. The multiple personalities of the chemokine receptor CCR7 in dendritic cells. *J Immunol* 2006; 176(9):5153-5159.

- Scheurich P**, Thoma B, Ucer U, Pfizenmaier K. Immunoregulatory activity of recombinant human tumor necrosis factor (TNF)-alpha: induction of TNF receptors on human T cells and TNF-alpha-mediated enhancement of T cell responses. *J Immunol* 1987; 138(6):1786-1790.
- Schnurr M**, Then F, Galambos P, Scholz C, Siegmund B, Endres S et al. Extracellular ATP and TNF-alpha synergize in the activation and maturation of human dendritic cells. *J Immunol* 2000; 165(8):4704-4709.
- Scholler N**, Hayden-Ledbetter M, Hellstrom KE, Hellstrom I, Ledbetter JA. CD83 is an I-type lectin adhesion receptor that binds monocytes and a subset of activated CD8+ T cells [corrected]. *J Immunol* 2001; 166(6):3865-3872.
- Scholler N**, Hayden-Ledbetter M, Dahlin A, Hellstrom I, Hellstrom KE, Ledbetter JA. Cutting edge: CD83 regulates the development of cellular immunity. *J Immunol* 2002; 168(6):2599-2602.
- Scholz C**, Toth B, Brunnhuber R, Rampf E, Weissenbacher T, Santoso L et al. Glycodelin A induces a tolerogenic phenotype in monocyte-derived dendritic cells in vitro. *Am J Reprod Immunol* 2008; 60(6):501-512.
- Schuler G**, Steinman RM. Murine epidermal Langerhans cells mature into potent immunostimulatory dendritic cells in vitro. *J Exp Med* 1985; 161(3):526-546.
- Schwartz RH**. T cell anergy. *Annu Rev Immunol* 2003; 21:305-334.
- Seppala M**, Taylor RN, Koistinen H, Koistinen R, Milgrom E. Glycodelin: a major lipocalin protein of the reproductive axis with diverse actions in cell recognition and differentiation. *Endocr Rev* 2002; 23(4):401-430.
- Sharpe AH**, Freeman GJ. The B7-CD28 superfamily. *Nat Rev Immunol* 2002; 2(2):116-126.
- Silver DF**, Hempling RE, Piver MS, Repasky EA. Effects of IL-12 on human ovarian tumors engrafted into SCID mice. *Gynecol Oncol* 1999; 72(2):154-160.
- Song M**, Ramaswamy S, Ramachandran S, Flowers LC, Horowitz IR, Rock JA et al. Angiogenic role for glycodelin in tumorigenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001; 98(16):9265-9270.
- Steinbrink K**, Paragnik L, Jonuleit H, Tuting T, Knop J, Enk AH. Induction of dendritic cell maturation and modulation of dendritic cell-induced immune responses by prostaglandins. *Arch Dermatol Res* 2000; 292(9):437-445.
- Steinman RM**, Cohn ZA. Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. I. Morphology, quantitation, tissue distribution. *J Exp Med* 1973; 137(5):1142-1162.
- Steinman RM**, Pack M, Inaba K. Dendritic cell development and maturation. *Adv Exp Med Biol* 1997; 417:1-6.
- Steinman RM**, Inaba K, Turley S, Pierre P, Mellman I. Antigen capture, processing, and presentation by dendritic cells: recent cell biological studies. *Hum Immunol* 1999; 60(7):562-567.
- Steinman RM**, Hawiger D, Nussenzweig MC. Tolerogenic dendritic cells. *Annu Rev Immunol* 2003; 21:685-711.
- Stephens SA**, Brownlie J, Charleston B, Howard CJ. Differences in cytokine synthesis by the sub-populations of dendritic cells from afferent lymph. *Immunology* 2003; 110(1):48-57.
- Sunamura M**, Sun L, Lozonchi L, Duda DG, Kodama T, Matsumoto G et al. The antiangiogenesis effect of interleukin 12 during early growth of human pancreatic cancer in SCID mice. *Pancreas* 2000; 20(3):227-233.
- Taga K**, Mostowski H, Tosato G. Human interleukin-10 can directly inhibit T-cell growth. *Blood* 1993; 81(11):2964-2971.
- Taniguchi M**, Seino K, Nakayama T. The NKT cell system: bridging innate and acquired immunity. *Nat Immunol* 2003; 4(12):1164-1165.
- Tee MK**, Vigne JL, Yu J, Taylor RN. Natural and recombinant human glycodelin activate a proapoptotic gene cascade in monocyte cells. *J Leukoc Biol* 2008; 83(4):843-852.
- Thurner B**, Roder C, Dieckmann D, Heuer M, Kruse M, Glaser A et al. Generation of large numbers of fully mature and stable dendritic cells from leukapheresis products for clinical application. *J Immunol Methods* 1999; 223(1):1-15.

- Trinchieri G.** Interleukin-12: a cytokine at the interface of inflammation and immunity. *Adv Immunol* 1998; 70:83-243.
- Van Cong N,** Vaisse C, Gross MS, Slim R, Milgrom E, Bernheim A. The human placental protein 14 (PP14) gene is localized on chromosome 9q34. *Hum Genet* 1991; 86(5):515-518.
- van den Nieuwenhof I,** Koistinen H, Easton RL, Koistinen R, Kamarainen M, Morris HR et al. Recombinant glycodelin carrying the same type of glycan structures as contraceptive glycodelin-A can be produced in human kidney 293 cells but not in chinese hamster ovary cells. *Eur J Biochem* 2000; 267(15):4753-4762.
- van Liempt E,** Bank CM, Mehta P, Garcia-Vallejo JJ, Kawar ZS, Geyer R et al. Specificity of DC-SIGN for mannose- and fucose-containing glycans. *FEBS Lett* 2006; 580(26):6123-6131.
- van Liempt E,** van Vliet SJ, Engering A, Garcia Vallejo JJ, Bank CM, Sanchez-Hernandez M et al. Schistosoma mansoni soluble egg antigens are internalized by human dendritic cells through multiple C-type lectins and suppress TLR-induced dendritic cell activation. *Mol Immunol* 2007; 44(10):2605-2615.
- van Nagell JJr,** DePriest PD, Ueland FR, DeSimone CP, Cooper AL, McDonald JM et al. Ovarian cancer screening with annual transvaginal sonography: findings of 25,000 women screened. *Cancer* 2007; 109(9):1887-1896.
- van Vliet SJ,** van Liempt E, Geijtenbeek TB, van Kooyk Y. Differential regulation of C-type lectin expression on tolerogenic dendritic cell subsets. *Immunobiology* 2006; 211(6-8):577-585.
- Van Die I,** van Vliet SJ, Nyame AK, Cummings RD, Bank CM, Appelmek B et al. The dendritic cell-specific C-type lectin DC-SIGN is a receptor for Schistosoma mansoni egg antigens and recognizes the glycan antigen Lewis x. *Glycobiology* 2003; 13(6):471-478.
- Walzer T,** Dalod M, Robbins SH, Zitvogel L, Vivier E. Natural-killer cells and dendritic cells: »l'union fait la force«. *Blood* 2005; 106(7):2252-2258.
- Wang J,** Zhang CQ, Liu J, Sui LH. [Effects of interleukin-12 transfection on proliferation of ovarian cancer SKOV3 cells in vitro and in vivo]. *Ai Zheng* 2007; 26(12):1292-1298.
- Westwood OM,** Chapman MG, Totty N, Philp R, Bolton AE, Lazarus NR. N-terminal sequence analysis of human placental protein 14, purified in high yield from decidual cytosol. *J Reprod Fertil* 1988; 82(2):493-500.
- Yamada N,** Katz SI. Generation of mature dendritic cells from a CD14+ cell line (XS52) by IL-4, TNF- α , IL-1 β , and agonistic anti-CD40 monoclonal antibody. *J Immunol* 1999; 163(10):5331-5337.
- Yang S,** Yang Y, Raycraft J, Zhang H, Kanan S, Guo Y et al. Melanoma cells transfected to express CD83 induce antitumor immunity that can be increased by also engaging CD137. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004; 101(14):4990-4995.
- Yaniv E,** Borovsky Z, Mishan-Eisenberg G, Rachmilewitz J. Placental protein 14 regulates selective B cell responses. *Cell Immunol* 2003; 222(2):156-163.
- Yu Y,** Hagihara M, Ando K, Gansuud B, Matsuzawa H, Tsuchiya T et al. Enhancement of human cord blood CD34+ cell-derived NK cell cytotoxicity by dendritic cells. *J Immunol* 2001; 166(3):1590-1600.
- Zhou LJ,** Schwarting R, Smith HM, Tedder TF. A novel cell-surface molecule expressed by human interdigitating reticulum cells, Langerhans cells, and activated lymphocytes is a new member of the Ig superfamily. *J Immunol* 1992; 149(2):735-742.
- Zhou LJ,** Tedder TF. Human blood dendritic cells selectively express CD83, a member of the immunoglobulin superfamily. *J Immunol* 1995; 154(8):3821-3835

6 Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
ABC	Avidin-Biotin-Komplex
APC	<i>antigen presenting cells</i>
Aquadest	Aqua destillata
BrdU	Bromdesoxyuridin
CCL	<i>chemokine ligand</i>
CD	<i>cluster of differentiation</i>
CO ₂	Kohlendioxid
CTL	zytotoxische T-Lymphozyten
DC	<i>dendritic cell</i>
DC-SIGN	DC-specific intercellular adhesion molecule grabbing non-integrin
DEAE	Diethylaminethylcellulose
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dsRNA	Doppelstrang-RNA
ELISA	<i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i>
FACS	<i>Fluorescence activated cell sorting</i>
FCS	<i>fetal calf serum</i>
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FPLC	<i>fast protein liquid chromatography</i>
Gd	Glykodelin
GM-CSF	<i>granulocyte macrophage colony-stimulating factor</i>
ICAM	<i>intercellular adhesion molecule</i>
gp	Glykoprotein
HIV	<i>human immunodeficiency virus</i>
HLA	Humane Leukozytenantigene
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
lacNAc	N-Acetylactosamin
lacdiNAc	di-N-Acetylactosamin
LPS	Lipopolysaccharid
MFI	<i>mean fluorescence index</i>

MHC	<i>Major Histocompatibility Complex</i>
MLR	<i>mixed lymphocyte reaction</i>
moDC	monozytenabgeleitete dendritische Zelle
mRNA	<i>messenger-RNA</i>
NK	natürliche Killerzelle
PBMC	<i>Peripheral Blood Mononuclear Cell</i>
PBS	<i>Phosphate-buffered saline</i>
PE	Phycoerythrin
PGE2	Prostaglandin E2
RNA	Ribonukleinsäure
SDS-PAGE	<i>sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis</i>
SEA	<i>soluble egg antigen</i>
SEM	<i>standard error of mean</i>
TAB	Tabelle
TCR	<i>T-cell-receptor</i>
TGF- β	<i>Transforming-growth-factor-β</i>
Th-Zellen	T-Helferzellen
TLR	<i>toll-like receptor</i>
TNF- α	Tumornekrosefaktor- α
Treg	regulatorische T-Zelle
WHO	<i>World Health Organization</i>

EINHEITEN

° C	Grad Celsius
μ	mikro-
g	Einheit der Schwerkraft auf der Erde (9.8m/s ²)
h	Stunde
I.E.	internationale Einheiten
IU	international units
kDA	kilo Dalton
l	Liter
m	milli-
min	Minute
ml	milliliter
mM	millimolar
MW	molecular weight
N	nano-
ng	nanogramm
nm	nanometer
pg	picogramm
U	Unit
V	Volt

7 Abbildungsverzeichnis

Tab. 1	Glykodelinisoformen und Vorkommen	7
Tab. 2	Übersicht Glykosilierungsmuster von GdA und GdS im Vergleich	10
Tab. 3	Überblick bekannte Funktionen der unterschiedlichen Glykodelinformen	11
Abb. 1	Molekularstruktur Glykodelin	9
Abb. 2	Differenzierung eines Monozyten zur dendritischen Zelle (im <i>in vitro</i> Modell)	13
Abb. 3	Der Werdegang einer dendritischen Zelle	15
Abb. 4	Vereinfachtes Modell einer T-Zell-abhängigen Steuerung der Immunantwort	18
Abb. 5	Zusammenfassende Übersicht Aufgaben der dendritischen Zelle	19
Abb. 6	Schematische Darstellung Chromatografieprinzip	25
Abb. 7	Sandwichprinzip immunhistochemischer Färbung	28
Abb. 8	Übersicht Zeitplan Generierung moDC und Stimulation mit TNF- α /IL-1 β bzw. Gd	32
Abb. 9	Vereinfachte Darstellung Geräteprinzip FACS	33
Abb. 10	Fluoreszenzspektrum verwendeter Farben im FACS	34
Abb. 11	Vereinfachte Darstellung Punktwolkenhistogramme (Dotplot)	35
Abb. 12	Dotblot	39
Abb. 13	Bradford-Proteinstandardkurve	40
Abb. 14	Westernblot-Analyse von Glykodelin aus Aszites	41
Abb. 15	Veränderte Expression dendritischer Oberflächenmarker im FACS	44
Abb. 16	Endozytotische Aktivität dendritischer Zellen	45
Abb. 17	Lymphoproliferative Aktivität dendritischer Zellen im BrdU-ELISA	46
Abb. 18	Zytokinsekretionsprofil dendritischer Zellen	48

8 Danksagung

Ganz herzlich bedanke ich mich bei meinem Doktorvater Prof. Dr. rer. nat. Udo Jeschke für die freundliche Aufnahme in seine Arbeitsgruppe, welche sich neben der wissenschaftlichen Prägung auch durch ein familiäres Klima auszeichnet. Vielen Dank für die allzeitige Ansprechbereitschaft und vielfältigen Anregungen.

Meinem Betreuer PD Dr. med. Christoph Scholz danke ich besonders – für die Themensetzung und Einführung in wissenschaftliches Arbeiten, die kontinuierliche Begleitung, regelmässigen Diskussionen und außerordentliche Förderung.

Allen Laborangestellten der Maistraße vielen Dank für die praktische Einführung / Einarbeitung in die erforderliche Methodik und stete tatkräftige Unterstützung. Ebenso herzlichen Dank für die freundliche Überlassung des FACS-Arbeitsplatzes im Labor der Abteilung für klinische Pharmakologie (Prof. Dr. med. S. Endres) in der Ziemssenstraße sowie Hilfestellung durch die dortigen Labormitarbeiter, insbesondere Rosi Kiefl.

Meiner lieben Mitdoktorandin Regina Brunnhuber danke ich für das kollegiale und freundschaftliche Verhältnis während unserer engen Zusammenarbeit.

Ein herzliches Dankeschön gilt auch allen Probanden für die bereitwillige Blutspende, ohne die die Durchführung der Experimente natürlich nicht möglich gewesen wäre.

Besonderen Dank möchte ich meinen Freunden Andi und Vroni für die unermüdliche Motivation und Hilfestellung aussprechen. Nicht zuletzt danke ich meiner Familie für die Ermöglichung des Studiums und immerwährende Unterstützung jeglicher Art.

9 Veröffentlichungen

Ergebnisse der vorliegenden Arbeit sind, mit Genehmigung der Fakultät, in folgenden Originalarbeiten veröffentlicht:

Wissenschaftliche Artikel

Christoph Scholz, **Elisabeth Rampf**, Bettina Toth, Regina Brunnhuber, Tobias Weissenbacher, Klaus Friese, Udo Jeschke: Ovarian Cancer-derived Glycodelin Impairs In Vitro, Dendritic Cell Maturation; Journal of Immunotherapy 2009; Volume 32, Issue 5, pp 492-497 (JIF 3.203)

Christoph Scholz, Bettina Toth, Regina Brunnhuber, **Elisabeth Rampf**, Tobias Weissenbacher, Laura Santoso, Klaus Friese, Udo Jeschke: Glykodelin A induces a Tolerogenic Phenotype in Monocyte-derived Dendritic Cells in vitro; American Journal of Reproductive Immunology 2008, Volume 60, Issue 6, pp 502-512 (JIF 2.130)

Poster

Elisabeth Rampf, Regina Brunnhuber, Udo Jeschke, Christoph Scholz, Klaus Friese: Isolierung von Glykodelin-O aus Ovarialkarzinomazites und immunologische Charakterisierung mit Hilfe dendritischer Zellen; 56. DGGG-Kongress Berlin 19.09.-22.09.2006